

Untersuchungen zu Mechanismen der Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit GPCRs

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nadja Mößlein

aus Marktheidenfeld

Marburg an der Lahn, 2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jens Kockskämper

Eingereicht am 01.06.2021

Tag der mündlichen Prüfung am 13.07.2021

Hochschulkennziffer: 1180

„*A*ny living cell carries with it the experiences
of a billion years of experimentation by its ancestors.
You cannot expect to explain so wise an old bird
in a few simple words.“

Max Delbrück (A Physicist Looks at Biology, 1949)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Publikationen/Grants	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	X
Summary	XII
Kapitel 1 Einleitung	2
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	2
1.1.1 Allgemeines	2
1.1.2 Grundaufbau und Klassifizierung von GPCRs	2
1.1.3 Aktivierung und Signaltransduktion von GPCRs	4
1.1.4 Abschaltung der Signaltransduktion	7
1.1.5 In dieser Arbeit verwendete GPCRs	8
1.2 Arrestin	13
1.2.1 Entdeckung und Grundstruktur der Arrestine	13
1.2.2 Internalisierung von Rezeptoren	16
1.2.3 Signalweiterleitung durch β -Arrestin	19
1.2.4 Posttranslationale Modifikationen von Arrestinen	22
1.2.4.1 Ubiquitinierung	22
1.2.4.2 SUMOylierung	27
1.3 Zielsetzung	29
Kapitel 2 Materialien	30
2.1 Verbrauchsmaterialien	30
2.2 Chemikalien	30
2.3 Geräte	33
2.4 Software und Datenbanken	35
2.5 Eukaryotische und prokaryotische Zelllinien	35
2.6 Plasmide	36
2.7 PCR-Primer	38

2.8 Puffer & Lösungen	40
2.8.1 Zellkultur	40
2.8.2 Klonierungen	40
2.8.3 Mikroskopie	43
2.8.4 Western Blots	43
2.8.5 Weitere verwendete Puffer	47
Kapitel 3 Methoden	48
3.1 Zellkultur	48
3.1.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen	48
3.1.2 Kultivierung von NIH/3T3-Zellen	48
3.1.3 Transiente Transfektion von Zellen mit Effectene [®]	49
3.1.4 Beschichten von Deckgläschen und 96-Well-Platten mit PLL	49
3.2 Molekularbiologische Methoden	50
3.2.1 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion	50
3.2.2 Mutagenese	52
3.2.3 Subklonierung	53
3.2.4 Restriktionsverdau	55
3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese	55
3.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	56
3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	56
3.2.8 Gibson-Assembly	57
3.2.9 Generierung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	59
3.2.10 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit TSB/KCM	60
3.2.11 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock	60
3.2.12 Herstellung von LB-Medium und LB-Agar-Platten	61
3.2.13 DNA-Präparationen	61
3.2.13.1 Mini-Präparation	61
3.2.13.2 Midi-Präparation	62
3.2.14 Messung von DNA-Konzentration und -Reinheit	63
3.2.15 Sequenzierung	63
3.3 Biophysikalische Methoden	64
3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie	64
3.3.1.1 Allgemeines	64
3.3.1.2 Fluoreszierende Proteine	64
3.3.1.3 Allgemeiner Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops	65

3.3.2 FRET-Experimente	66
3.3.2.1 Grundlagen des Förster-Resonanz-Energie-Transfers	66
3.3.2.2 Voraussetzungen für FRET	66
3.3.2.3 Mikroskop für FRET-Messungen	68
3.3.2.4 Fluorophore – Falschanregung und Durchbluten	69
3.3.2.5 Durchführung und Auswertung von FRET-Messungen am Mikroskop	70
3.3.2.6 FRET-Messungen im Tecan Spark (Plattenreader)	73
3.3.3 BRET-Experimente	74
3.3.3.1 Grundlagen des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers	74
3.3.3.2 Luziferasen und Substrate	75
3.3.3.3 Durchführung und Auswertung von BRET-Experimenten	76
3.3.4 Konfokalmikroskopie	77
3.3.4.1 Allgemeines	77
3.3.4.2 Colokalisation	78
3.3.4.3 Konfokalmikroskop	79
3.3.4.4 Durchführung und Auswertung	81
3.3.5 FRAP-Experimente	82
3.3.5.1 Grundlagen der Fluorescence Recovery After Photobleaching	82
3.3.5.2 Mikroskop und verwendete fluoreszierende Proteine	84
3.3.5.3 Durchführung und Auswertung von FRAP-Messungen	84
3.4 Protein-biochemische Methoden	88
3.4.1 Expression von Proteinen in Rosetta-Zellen	88
3.4.2 Vorbereitung von Protein-Proben	88
3.4.3 Proteinquantifizierung nach Bradford	89
3.4.4 Immunopräzipitation	90
3.4.5 Analyse der Proteinstabilität mit Cycloheximid	90
3.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	91
3.4.7 Western Blot	92
3.4.8 Immunochemische Detektion	93
3.4.9 Strippen von PVDF-Membranen	94
3.5 Statistik	94

Kapitel 4 Ergebnisse	96
4.1 Untersuchung der Ubiquitinierung von Arrestin-3	96
4.1.1 Bedeutung der Lysine 11 und 12 als Ubiquitinierungsstellen	96
4.1.2 Identifikation von Ubiquitinierungsstellen, die die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren beeinflussen	107
4.1.2.1 Untersuchung einer lysinlosen Arrestin-3-Mutante	107
4.1.2.2 Zeitabhängige Ubiquitinierung von Arrestin-3	109
4.1.2.3 Identifikation von Ubiquitinierungsstellen mittels Massenspektrometrie	112
4.1.2.4 Untersuchung der Punktmutation K178R	114
4.1.2.5 Untersuchung weiterer Lysin-zu-Arginin-Punktmutationen	118
4.1.2.6 Kombination der Punktmutationen in Mehrfachmutanten	123
4.1.3 Untersuchung von Inhibitoren posttranslationaler Modifikationen	142
4.1.3.1 Untersuchung des Ubiquitinierungs-Inhibitors TAK-243	142
4.1.3.2 Untersuchung des SUMOylierungs-Inhibitors 2-D08	148
4.2 Untersuchung von Agonisten mit verschiedenen Dissoziationshalbwertszeiten	150
Kapitel 5 Diskussion	154
5.1 Methoden	154
5.2 Einfluss der Ubiquitinierung von Arrestin-3 auf die Internalisierung	157
5.2.1 Untersuchung der Lysine 11 und 12 als Ubiquitinierungsstellen	157
5.2.2 Identifikation weiterer Ubiquitinierungsstellen, die die Co-Internalisierung mit GPCRs beeinflussen	160
5.2.3 Untersuchung von Inhibitoren posttranslationaler Modifikationen	164
5.2.4 Fazit	165
5.3 Einfluss von Agonisten mit verschiedenen Bindungshalbwertszeiten auf die Internalisierung	166
Literaturverzeichnis	168
Abbildungsverzeichnis	190
Tabellenverzeichnis	194
Erklärung	196
Lebenslauf	197
Danksagung	198

Publikationen/Grants

Veröffentlichte Manuskripte

Mösslein, N., Pohle, L.-M. G., Fuss A., Bünemann, M., Krasel, C.

"Residency time of agonists does not affect the stability of GPCR-arrestin complexes"

British Journal of Pharmacology (in Revision)

Jelinek, V., **Mösslein, N.**, Bünemann, M.

"Structures in G proteins important for subtype selective receptor binding and subsequent activation"

Communications Biology, 4:635. 2021

Carvalho, J., Chennupati, R., Li, R., Günther, S., Kaur, H., Zhao, W., Tonack, S., Kurz, M., **Mösslein, N.**, Bünemann, M., Offermanns, S. and Wettschureck, N.

"Orphan G protein-coupled receptor GPRC5B controls smooth muscle contractility and differentiation by inhibiting prostacyclin receptor signaling"

Circulation, 141(14):1168–1183. 2020

Miess, E., Gondin, A. B., Yousuf, A., Steinborn, R., **Mösslein, N.**, Yang, Y., Göldner, M., Ruland, J. G., Bünemann, M., Krasel, C., Christie, M. J., Halls, M. L., Schulz, S., and Canals, M.

"Multisite phosphorylation is required for sustained interaction with GRKs and arrestins during rapid μ -opioid receptor desensitization"

Science Signaling 11(539):1–16. 2018

Konferenzbeiträge und Abstracts

Vorträge:

BPC Retreat, 2019 (Rauischholzhausen)

"Co-internalization of arrestin3 with G protein-coupled receptors is independent of ubiquitination of Lys11 or Lys12"

7th Focused Meeting on Cell Signalling, 2018 (Nottingham, UK)

"Mutation of lysines to arginines in the arrestin N-terminus lowers arrestin affinity to GPCRs by attenuating the release of the arrestin C-terminus"

Posterpräsentationen:*5th German Pharm-Tox Summit, 2020 (Leipzig)*

"Identification of amino acids that govern the intracellular trafficking of arrestin-3"

Mösslein, N., Bünemann, M., Krasel, C.

(Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 393, Suppl 1)

ReceptorLight Symposium No. 2, 2019 (Jena)

"Co-internalization of arrestin3 with G protein-coupled receptors is independent of ubiquitination of Lys11 or Lys12"

Mösslein, N., Zindel, D., Tiemann, J. K. S., Sommer, M. E., Pin, J.-P., Prézeau, L., Hildebrand, P. W., Bünemann, M., Krasel, C.

4th German Pharm-Tox Summit, 2019 (Stuttgart)

"Co-internalization of arrestin3 with G protein-coupled receptors is independent of ubiquitination of Lys11 or Lys12"

Mösslein, N., Zindel, D., Tiemann, J. K. S., Sommer, M. E., Pin, J.-P., Prézeau, L., Hildebrand, P. W., Bünemann, M., Krasel, C.

(Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 392, Suppl 1)

3rd German Pharm-Tox Summit, 2018 (Göttingen)

"Mutation of lysines to arginines in the arrestin N-terminus lowers arrestin affinity to GPCRs by attenuating the release of the arrestin C-terminus"

Mösslein, N., Zindel, D., Tiemann, J. K. S., Sommer, M. E., Pin, J.-P., Prézeau, L., Hildebrand, P. W., Bünemann, M., Krasel, C.

(Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 391 Suppl 1)

ReceptorLight Symposium No. 1, 2017 (Würzburg)

"Role of Phosphoserine and Phosphothreonine for binding of arrestin to G protein-coupled receptors"

Mösslein, N., Bünemann, M., Krasel, C.

2nd German Pharm-Tox Summit, 2017 (Heidelberg)

"Role of Phosphoserine and Phosphothreonine for binding of arrestin to G protein-coupled receptors"

Mösslein, N., Bünemann, M., Krasel, C.

(Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 390, Suppl 1)

Grants

DAAD Kongressreisen-Stipendium, 2020

Marburg International Doctorate (DAAD) Reisestipendium, 2018

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AP-2	Adaptin-2-Komplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arr3	Arrestin-3
AT ₁ R	Angiotensin-1-Rezeptor
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	<i>Arbitrary unit</i>
β ₁ AR	β ₁ -adrenerger Rezeptor
β ₂ AR	β ₂ -adrenerger Rezeptor
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszens-Resonanz-Energie-Transfer
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCP	<i>Clathrin-coated pits</i> , clathrinbedeckte Stachelsaumgrübchen
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i> , cyan fluoreszierendes Protein
CHX	Cycloheximid
DAG	Diacylglycerol
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enkephalin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Zellkulturmedium)
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ECL	<i>Extracellular loop</i> , extrazelluläre Schleife
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
EP4	Prostaglandin-E ₂ -Rezeptor 4
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
F	Fluoreszenzemission
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase

GTP	Guanosintriphosphat
HEK-Zellen	<i>Human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzellen
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICL	<i>Intracellular loop</i> , intrazelluläre Schleife
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierten Proteinkinase
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i> (E3-Ligase)
μOR	μ-Opioidrezeptor
NEB	New England Biolabs
NK1R	Neurokinin-1-Rezeptor
NTSR1	Neurotensin-1-Rezeptor
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD	phosphorylierungsdefizient
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase Cβ
PLL	Poly-L-Lysin
PTH	Parathormon
PTHR	Parathyroidhormon-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROI	<i>Region of interest</i>
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
U/min	Umdrehungen pro Minute
V ₂ R	Vasopressin-2-Rezeptor
WT	Wildtyp
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein

Zusammenfassung

Arrestine sind eine kleine Familie von vier Proteinen, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) spielen. Neben ihrer Funktion in der Desensibilisierung des G-Protein-Signalwegs sind sie auch für die Internalisierung aktivierter GPCRs zuständig. Je nachdem, ob Arrestin dabei am Rezeptor gebunden bleibt oder abdissoziiert, werden GPCRs in zwei Klassen eingeteilt. Klasse-A-Rezeptoren wie der β_2 AR werden nach einer transienten Interaktion mit Arrestin alleine in Endosomen transportiert, wohingegen Klasse-B-Rezeptoren wie der AT_1 R oder PTHR stabile Komplexe mit Arrestinen bilden und gemeinsam ins Zellinnere co-internalisieren. Die Ursache für das unterschiedliche Internalisierungsverhalten verschiedener Rezeptoren mit Arrestinen ist bisher nicht abschließend erforscht und wurde daher in dieser Arbeit näher untersucht.

Bislang wird in diesem Zusammenhang vermutet, dass eine langanhaltende Ubiquitinierung des Arrestins, die nur durch Klasse-B-Rezeptoren induziert wird, für die Co-Internalisierung von Arrestin entscheidend ist. Deshalb war es im ersten Teil dieser Arbeit das Ziel, die Co-Internalisierung des Arrestins mit Klasse-B-Rezeptoren durch die Elimination von Lysinresten, an die Ubiquitin üblicherweise geknüpft wird, zu verhindern.

Den Lysinen 11 und 12 in Arrestin-3 wird bisher eine wichtige Rolle für die Internalisierung von Arrestin zugeschrieben, da deren Austausch durch Arginine (KK11RR) dazu führt, dass diese Doppelmutante nicht mehr mit dem AT_1 R in die Zelle internalisiert (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Außerdem interagiert sie nur noch transient mit weiteren Klasse-B-Rezeptoren (Zindel, 2015). Da Docking-Untersuchungen jedoch zeigen konnten, dass die eingefügten Arginine durch intramolekulare Wechselwirkungen die inaktive Konformation von Arrestin stabilisieren, wurde versucht, diesen Effekt der KK11RR-Mutation durch das zusätzliche Einfügen destabilisierender Mutationen umzukehren. Dafür wurden einerseits die Interaktionspartner der Arginine zu Alaninen mutiert (ED389AA) und zum anderen die Mutation R170E eingefügt, die Arrestin-3 in eine präaktivierte Konformation bringt (Granzin *et al.*, 2015). Tatsächlich konnte durch die Kombination von KK11RR mit diesen Mutationen erreicht werden, dass diese Arrestin-Mutanten wieder stabile Komplexe mit Klasse-B-Rezeptoren bilden und mit gemeinsam diesen internalisiert werden. Außerdem zeigten sowohl Arr3 KK11RR R170E als auch Arr3 KK11RR ED389AA nach der Stimulation des PTHR eine für Klasse-B-Rezeptoren typische stabile Ubiquitinierung, die in ihrem Ausmaß der von Wildtyp-Arrestin entsprach. Somit konnte bestätigt werden, dass Arr3 KK11RR nach dem Einfügen zusätzlicher destabilisierender Mutationen wieder mit Klasse-B-Rezeptoren co-internalisiert und die beiden Lysine 11 und 12 dafür nicht zwingend als Ubiquitinierungsstellen zur Verfügung stehen müssen.

Da Arrestin-3 nach der vollständigen Elimination aller potenziellen Ubiquitinierungsstellen durch Austausch aller Lysine durch Arginine kaum noch an GPCRs binden konnte, wurden im nächsten Teil der Arbeit stattdessen nur einzelne nachgewiesene Ubiquitinierungsstellen aus Arrestin-3 entfernt, die durch eine massenspektrometrische Untersuchung und Literaturrecherche iden-

tifiziert wurden. Da jedoch alle acht Arrestin-Einzelmutanten weiterhin mit dem PTHR co-internalisierten, wurden als nächstes alle Lysin-zu-Arginin-Mutationen in einem Arrestin vereint. Diese Mehrfachmutante zeigte mit dem PTHR ein sehr variables Internalisierungsverhalten und colokalisierte mit dem Rezeptor nur in manchen Zellen, während der Rezeptor in anderen Zellen alleine in Endosomen aufgenommen wurde. Da der Grund für diesen uneinheitliche Phänotyp nicht geklärt werden konnte, wurde die Anzahl der Mutationen daraufhin schrittweise reduziert, um herauszufinden, welche der Punktmutationen für eine reduzierte Co-Internalisierung der Arrestin-Mutante mindestens kombiniert werden müssen. Dies führte auch zu einem weniger variablen Internalisierungsverhalten mit Klasse-B-Rezeptoren. Letztendlich konnten die relevanten Mutationen auf die Lysine 108 und 178 in Arrestin-3 eingegrenzt werden, da die Arrestin-Doppelmutante Arr3 K108R K178R mit mehreren untersuchten Klasse-B-Rezeptoren nicht mehr in die Zelle aufgenommen wurde. Trotzdem wurde in FRAP-Messungen (*Fluorescence recovery after photobleaching*) festgestellt, dass Arr K108R K178R mit einem aktivierten Klasse-B-Rezeptor genauso langlebige Komplexe bildet wie Wildtyp-Arrestin, was somit bedeutet, dass die reduzierte Co-Internalisierung von Arr3 K178R K108R nicht auf einer weniger stabilen Bindung der Mutante am Rezeptor beruht. Inwiefern stattdessen tatsächlich die reduzierte Ubiquitinierung von Arr3 K178R K108R verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Um zu überprüfen, welche Bedeutung posttranslationale Modifikationen für die Co-Internalisierung von Arrestinen mit Klasse-B-Rezeptoren haben, wurde zunächst durch den Inhibitor TAK-243, der die wichtigste E1-Ligase Uba1 hemmt, der Großteil der zellulären Ubiquitinierung blockiert. Die Internalisierung von Arrestin-3 wurde zwar durch die Applikation von TAK-243 nicht beeinträchtigt, jedoch ist nicht gesichert, dass die Ubiquitinierung von Arrestin-3 durch den Inhibitor tatsächlich verhindert wird. Durch den SUMOylierungs-Inhibitor 2-D08 wurde die Co-Internalisierung des Arrestins ebenfalls nicht verhindert, sodass die Ubiquitinierung und SUMOylierung nach den Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich nicht entscheidend für die Internalisierung von Arrestin-3 sind.

Im letzten Teil der Arbeit wurde mithilfe verschiedener Agonisten des μ OR mit unterschiedlichen Bindungshalbwertszeiten untersucht, ob Liganden, die besonders lange am Rezeptor gebunden bleiben, auch eine stabilere Bindung des Arrestins induzieren. Anhand von FRAP-Experimenten wurde jedoch festgestellt, dass die Austauschrate des Arrestins am μ OR durch die unterschiedliche Bindungsdauer der einzelnen Agonisten nicht verändert wurde. Außerdem führten Agonisten mit besonders langer Bindungsdauer weder am μ OR noch am β_2 AR dazu, dass Arrestin mit den Klasse-A-Rezeptoren in die Zelle internalisierte. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Affinität von Rezeptoragonisten das Klasse-A oder Klasse-B-Verhalten eines Rezeptors nicht verändert und daher keinen Einfluss auf die Co-Internalisierung von Arrestin hat.

Summary

Arrestins are a small family of four proteins that play an important role in the signal transduction of G protein-coupled receptors (GPCRs). Besides desensitizing the G protein signaling, they also induce the internalization of GPCRs. Based on the apparent stability of arrestin-receptor complexes, GPCRs are classified into two groups. Class A receptors such as the β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) interact only transiently with arrestins and arrestin dissociates during the endocytic process, whereas class B receptors like the angiotensin type 1 (AT_1R), or parathyroid hormone receptor (PTHr) form very stable complexes with arrestins that co-internalize into endosomes. However, the underlying mechanisms explaining why arrestins only co-internalize with class B receptors are still largely unknown and were therefore examined in more detail in this thesis.

The most prominent hypothesis to date is that class B receptors induce sustained ubiquitination of arrestin, which is necessary for the co-internalization of arrestin-receptor complexes. Therefore, in the first part of this thesis, several lysine residues of arrestin-3, which usually serve as acceptors for ubiquitin, were eliminated to prevent the co-internalization with class B receptors.

So far it is thought that the ubiquitination of the lysine residues 11 and 12 is necessary to induce the internalization of arrestin-3, as mutation of these lysines to arginines prevents the co-internalization of the arrestin-mutant with the AT_1R (Shenoy and Lefkowitz, 2005). In addition, Arr3 KK11RR interacts only transiently with several other class B receptors (Zindel, 2015). However, docking experiments showed that the inserted arginines display stronger intramolecular interactions with the arrestin C-terminus and thereby stabilize its inactive conformation. Therefore, further destabilizing mutations were inserted into Arr3 KK11RR to reverse this effect. On the one hand, the interaction partners of the arginines were mutated to alanines (ED389AA), and on the other hand, the mutation R170E was introduced, leading to a pre-activated conformation of arrestin (Granzin *et al.*, 2015). Indeed, the combination of KK11RR with these rescue mutations led to the formation of stable complexes with class B receptors and their co-internalization. Furthermore, both Arr3 KK11RR R170E and Arr3 KK11RR ED389AA displayed robust and sustained ubiquitination typically observed after stimulation of class B receptors similar to wild-type arrestin-3. Thus, we could confirm that Arr3 KK11RR can internalize with class B receptors after insertion of destabilizing mutations, and the lysine residues 11 and 12 do not have to be available as ubiquitination sites.

As the elimination of all potential ubiquitination sites in arrestin-3 by mutation of all lysine residues to arginines resulted in a mutant that showed barely any recruitment to agonist-activated receptors, only proven ubiquitination sites (identified by mass-spectrometry or literature review) were removed. Since eight lysine to arginine single mutants of arrestin-3 still co-internalized with the PTHr, we next combined all of these mutations. The resulting arrestin mutant

displayed an inconsistent internalization with the PTHR and colocalized with the receptor only in some cells. As the cause for this variable phenotype could not be identified, the number of mutations in arrestin-3 was next reduced successively to identify those lysine to arginine mutations that influence the co-internalization with class B receptors. This also led to a more consistent co-internalization with these GPCRs. In the end, the relevant mutations could be narrowed down to the lysine residues 108 and 178 as the double mutant Arr3 K108R K178R was no longer co-internalized with several class B receptors. Moreover, FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) measurements showed that the complexes between this mutant and an agonist-activated class B receptor were as stable as with wild-type arrestin-3, suggesting that the reduced co-internalization of Arr3 K108R K178R was not based on a less stable receptor binding. However, the question remains whether the impaired co-internalization can indeed be attributed to the reduced ubiquitination of this arrestin mutant.

To examine the role of posttranslational modifications in the co-internalization of arrestin-3 with class B receptors, we first prevented the cellular ubiquitination with an inhibitor of the most prominent E1-ligase Uba1, TAK-243. Even though this did not impair the co-internalization of arrestin with class B receptors, it is not completely sure whether TAK-243 indeed prevents the ubiquitination of arrestin-3. As the SUMOylation inhibitor 2-D08 did not affect the internalization of arrestin-3 either, both ubiquitination and SUMOylation do not play a major role in the co-internalization of arrestin with class B receptors according to this thesis.

In the last part of the thesis, several agonists for the μ -opioid receptor (μ OR) with different dissociation half-lives were employed to examine whether ligands with particularly slow off-rates also induce the formation of more stable receptor-arrestin complexes. However, FRAP experiments demonstrated that the exchange rate of arrestin-3 at the μ OR is not affected by the dissociation half-life of the agonist. Furthermore, agonists with very slow off-rates could not induce co-internalization of arrestin-3 with the class A receptors μ OR and β_2 AR. In conclusion, the dissociation half-lives of agonists do not affect class A or class B behavior of GPCRs and therefore do not influence the co-internalization of arrestins.

Kapitel 1 | Einleitung

1.1 | G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.1.1 | Allgemeines

Die Fähigkeit, auf externe physikalische und chemische Reize reagieren zu können und sich schnell und präzise an ständig wechselnde Umgebungsbedingungen anzupassen, ist für jede Zelle überlebensnotwendig. Damit solche extrazellulären Informationen ins Zellinnere übermittelt werden können, sind verschiedene signalvermittelnde Rezeptoren in die Plasmamembran eingebettet, die eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli in die passende intrazelluläre Reaktion übersetzen. Neben Ionenkanalrezeptoren und enzymgekoppelten Rezeptoren wie Tyrosinkinasen stellen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) mit mehr als 800 verschiedenen Vertretern die größte Familie dieser Transmembransensoren dar, die von etwa 2 % des humanen Genoms codiert werden (Frederiksson *et al.*, 2003, Allen und Roth, 2011). Sie können sowohl exogene als auch endogene Reize wahrnehmen und sind an nahezu jedem physiologischen Prozess wie beispielsweise Sehen, Riechen oder Schmecken sowie der Regulation von Verhalten und Stimmung, des Immunsystems oder des Metabolismus beteiligt (Stauch und Cherezov, 2018). Aufgrund dieser zahlreichen essentiellen Funktionen sind GPCRs nicht nur in viele pathologische Vorgänge involviert (Thompson *et al.*, 2008), es macht sie auch zu einer der wichtigsten Zielstrukturen für Arzneimittel. Etwa 33 % der auf dem Markt zugelassenen niedermolekularen Wirkstoffe adressieren GPCRs und greifen so in deren Signalwege ein (Santos *et al.*, 2017). Wenn ein GPCR durch die Bindung eines Agonisten (meist auf der extrazellulären Seite des Rezeptors) aktiviert wird, löst dies eine Konformationsänderung des gesamten Proteins aus, welche auf der intrazellulären Seite die Bindung und Aktivierung von Effektoren, wie z.B. den für die Rezeptoren namensgebenden G-Proteinen, ermöglicht und so eine Signalkaskade aktiviert, die eine spezifische Reaktion der Zelle auf externe Reize ermöglicht.

1.1.2 | Grundaufbau und Klassifizierung von GPCRs

Trotz der niedrigen Sequenzhomologie zwischen den einzelnen GPCRs (Probst *et al.*, 1992) weisen alle Mitglieder dieser Superfamilie eine weitgehend homogene Topologie der sieben membran-durchspannenden α -Helices auf, aufgrund welcher die Rezeptoren auch als 7-Transmembranrezeptoren (7TMR) bezeichnet werden. Diese helikalen Membrandomänen sind durch drei extrazelluläre (*extracellular loops*, ECL1–3) und drei intrazelluläre Schleifen (*intracellular loops*, ICL1–3) verbunden, die sich in ihrer Größe und Struktur stark unterscheiden (Kobilka, 2006). Der N-Terminus des Rezeptors befindet sich hierbei außerhalb der Zelle, während der C-Terminus zusammen mit der Helix 8 intrazellulär liegt. Abb. 1.1 A zeigt die typische zweidimensionale Darstellung

eines GPCRs. Die Helices liegen jedoch nicht nebeneinander in der Zellmembran, sondern bilden einen Ring, wie die Kristallstruktur des β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 AR) (Abb. 1.1 B) verdeutlicht.

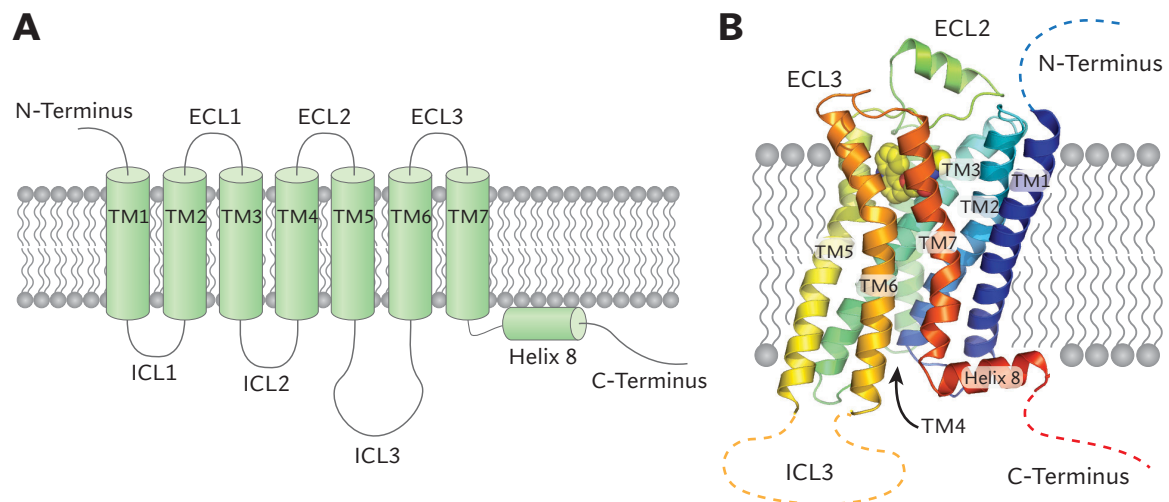


Abbildung 1.1 | Typischer Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors

A Schematische Darstellung der Transmembranhelices (TM) sowie extra- und intrazellulären Schleifen (ECL bzw. ICL) eines GPCRs.

B Struktur des β_2 AR mit dem Liganden Carazolol (gelbe Kugeln hinter TM6 und TM7). Nicht aufgelöste, flexible Strukturen wie der ICL3 sowie C- und N-Terminus sind durch gestrichelte Linien dargestellt. (Abbildung B verändert nach Erlandson *et al.*, 2018.)

Anhand phylogenetischer Merkmale können GPCRs nach dem sogenannten GRAFS-Systems in fünf Gruppen aufgeteilt werden: In **G**lutamat-ähnliche, **R**hodopsin-ähnliche, **A**dhäsions-, **F**riz-zled/Taste2- und **S**ekretin-Rezeptoren (Frederiksson *et al.*, 2003). Die Klassifikation der *International Union of Pharmacology* (IUPHAR) in die sechs Klassen A–F (Alexander *et al.*, 2019) stimmt weitgehend mit dieser Einteilung überein, wobei die größte und bei weitem am besten charakterisierte dieser Unterfamilien, die Rhodopsin-artigen Rezeptoren mit ungefähr 700 Vertretern (Stevens *et al.*, 2013), dort als Klasse A bezeichnet wird. Neben dem GPCR Rhodopsin, welcher im Auge für die Wahrnehmung von Photonen und damit für das Sehen zuständig ist, gehören zu dieser Klasse auch 388 olfaktorische Rezeptoren, die von verschiedenen Duftstoffen aktiviert werden, sowie viele weitere GPCRs, an denen unterschiedlichste Moleküle als Liganden binden. Die Einordnung von GPCRs in die Klassen A und B bezieht sich in dieser Arbeit jedoch nicht auf die eben vorgestellte Klassifizierung, sondern auf die Einteilung von Rezeptoren anhand ihres Internalisierungsverhaltens mit Arrestinen, was in Kap. 1.2.2 näher erläutert wird.

1.1.3 | Aktivierung und Signaltransduktion von GPCRs

Obwohl die verschiedenen GPCRs von sehr diversen Molekülen wie Photonen, Nukleotiden, Steroiden, Lipiden, Aminen oder Peptiden aktiviert werden, durchlaufen sie auf dem Weg zu ihrem aktiven Zustand ähnliche Änderungen in ihrer dreidimensionalen Struktur. Da in den vergangenen Jahren immer mehr Rezeptorstrukturen in verschiedenen Konformationen aufgelöst werden konnten (Congreve *et al.*, 2020), konnte aus dem Vergleich zwischen aktiven und inaktiven Strukturen ein breites Verständnis der einzelnen konformationellen Änderungen, die während der Aktivierung eines GPCRs ablaufen, gewonnen werden. Nach der Bindung eines Agonisten in die meist extrazelluläre Bindetasche wird ausgehend von dort eine Umlagerung des Rezeptors über zahlreiche konservierte Strukturen ausgelöst (Zhou *et al.*, 2019). Dies resultiert in einer Konformationsänderung der Transmembran-Helices, die sich am stärksten auf die intrazelluläre Seite des GPCRs auswirkt. Dort ordnen sich vor allem die Helices 5, 6 und 7 neu an und geben so durch Auswärtsbewegungen die Bindestelle für Effektormoleküle frei (Rasmussen, DeVree *et al.*, 2011) (Abb. 1.2). Da sich hierdurch insbesondere der ICL3 (zwischen TM5 und TM6), nach außen bewegt, können diese Konformationsänderungen durch das Einfügen von Fluorophoren in diese Schleife sowie den C-Terminus des Rezeptors mithilfe von Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) in Echtzeit untersucht werden (Vilardaga *et al.*, 2003, Haider *et al.*, 2019). Die intrazelluläre Bindung von Signalmolekülen wie G-Proteinen oder Arrestinen führt umgekehrt auch dazu, dass die Bindetasche des Liganden verengt wird und so dessen Affinität gesteigert wird (Gurevich *et al.*, 1997, Warne *et al.*, 2019).

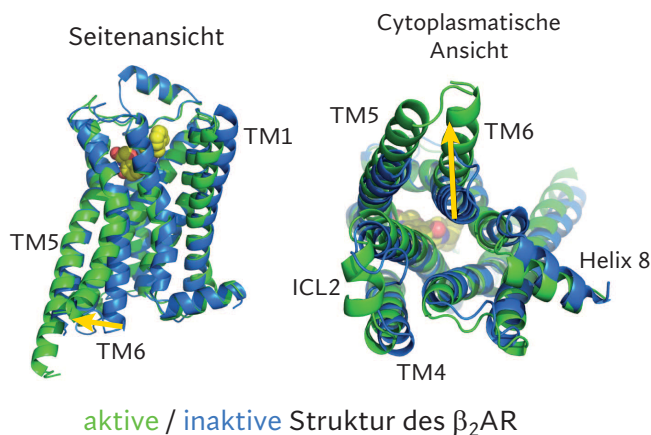


Abbildung 1.2 | Vergleich der aktiven und inaktiven Konformation des β_2 AR

Die aktive Kristallstruktur aus einem β_2 AR-Gs-Komplex ist in grün dargestellt, die inaktive, Carazolol-gebundene Struktur in blau. Die besonders große Auswärtsbewegung der TM6 von ca. 14 Å ist in der Seiten- und cytoplasmatischen Ansicht durch einen gelben Pfeil hervorgehoben. (Abbildung verändert nach Rasmussen, DeVree *et al.*, 2011.)

Durch die ligandeninduzierte Auswärtsbewegung der Transmembrandomänen vergrößert sich der intrahelikale Hohlraum des Rezeptors, was für die Bindung und Aktivierung von Signalmolekülen, unter anderem den G-Proteinen (kurz für Guanin-Nukleotid-bindende Proteine), wichtig ist. Diese G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$, die im inaktiven Zustand als Heterotrimer vorliegen, wobei an der α -Untereinheit GDP gebunden ist. Durch die Aktivierung des G-Proteins durch einen GPCR wird das GDP durch ein GTP-Molekül ausgetauscht

sowie eine strukturelle Änderung des Heterotrimers ausgelöst, die zur Dissoziation vom Rezeptor sowie zur Trennung der $G\alpha$ -Untereinheit vom konstitutiven Dimer aus β - und γ -Untereinheit (bzw. einer konformationellen Umordnung des G-Proteins) führt (Vilardaga *et al.*, 2009). Sowohl $G\alpha$ als auch $G\beta\gamma$ können nun mit vielfältigen weiteren Effektormolekülen wie Ionenkanälen oder membranverankerten Enzymen interagieren, diese aktivieren oder hemmen und so verschiedene zelluläre Antworten auslösen (Milligan und Kostenis, 2006). Dies geschieht so lange, bis das an der α -Untereinheit gebundene GTP durch deren GTPase-Domäne zu GDP hydrolysiert wird, woraufhin sich das heterotrimere G-Protein wieder zusammenlagert und für eine erneute Aktivierung durch GPCRs zur Verfügung steht (Abb. 1.3).

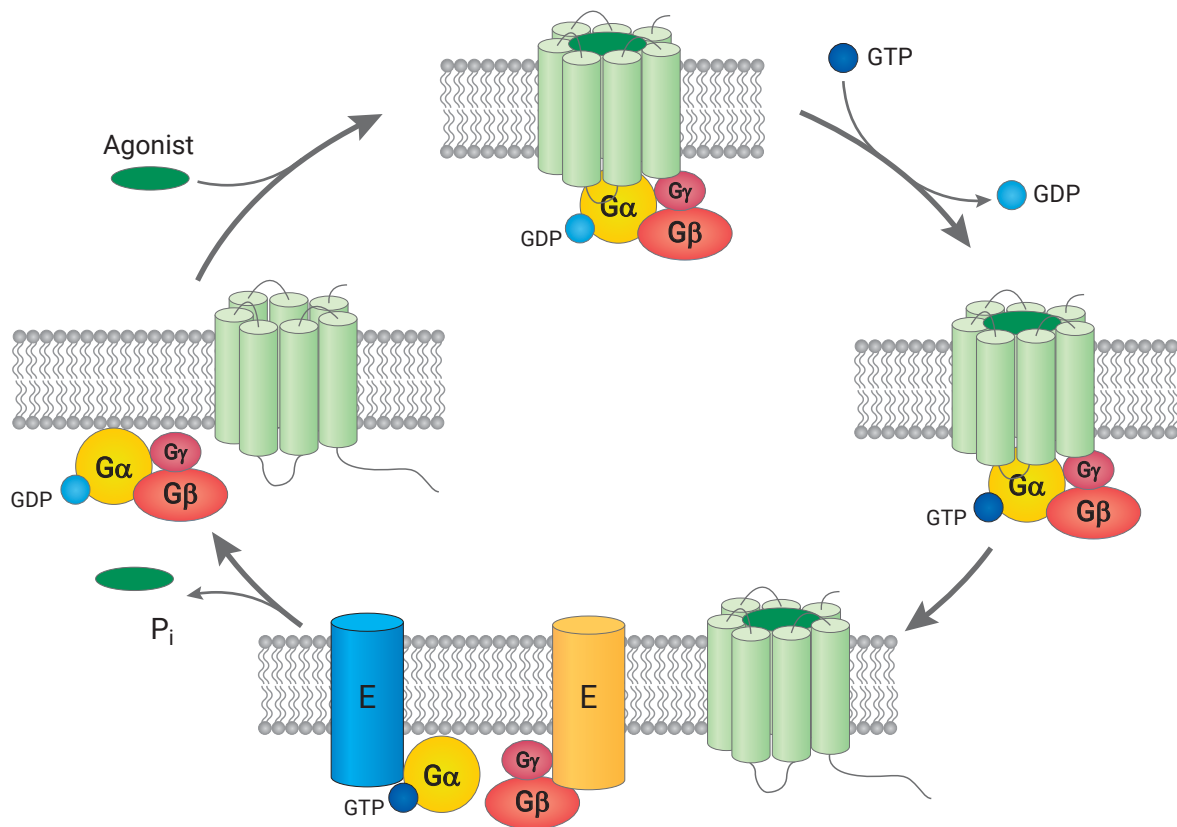


Abbildung 1.3 | Schematische Darstellung des G-Protein-Zyklus

Das inaktive G-Protein liegt als Heterotrimer vor und hat an der α -Untereinheit GDP gebunden (links). Nach Aktivierung des GPCRs durch einen Agonisten kann das G-Protein an den Rezeptor binden (oben). Der Rezeptor katalysiert den Austausch von GDP durch GTP (rechts), was zur Aktivierung des G-Proteins und damit zur Dissoziation vom Rezeptor sowie zur Trennung des Heterotrimers führt. Sowohl $G\alpha$ als auch $G\beta\gamma$ können nun mit Effektorproteinen (E) interagieren (unten), bis das G-Protein durch die Hydrolyse des GTPs in GDP und P_i wieder in den inaktiven Zustand übergeht und sich das Heterotrimer erneut zusammenlagert.

Obwohl GPCRs durch so diverse Liganden aktiviert werden, koppeln sie nur an verhältnismäßig wenige unterschiedliche G-Proteine, die jeweils verschiedene weiterführende Signalkaskaden in der Zelle auslösen. So kommen im menschlichen Genom nur 16 verschiedene Gene für $G\alpha$ -Proteine vor, die anhand funktioneller Aspekte und ihrer Sequenzhomogenität in vier große Gruppen eingeteilt werden können: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ (Simon *et al.*, 1991, Downes

und Gautam, 1999). Jede dieser Familien aktiviert andere Effektorproteine und führt damit zu unterschiedlichen zellulären Antworten. Da G_s -Proteine Adenylylcyclasen (AC) stimulieren und damit zur Bildung von cyclischem AMP (cAMP) aus ATP führen, werden diese als stimulatorische G-Proteine bezeichnet. Der *Second messenger* cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die eine Reihe intrazellulärer Proteine phosphoryliert und dadurch deren Funktion regulieren kann (Syrovatkina *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu hemmen inhibitorische G_i -Proteine Adenylylcyclasen und senken dadurch die cAMP-Konzentration in der Zelle (Simon *et al.*, 1991). Des Weiteren wirken G_i -Proteine über ihre $G\beta\gamma$ -Untereinheit direkt aktivierend auf GIRK-Kanäle (*G protein-activated inwardly rectifying K^+ -channel*), die durch den Ausstrom von Kalium aus der Zelle zur Hyperpolarisation führen (Glaaser und Slesinger, 2015). G_q -Proteine (zu welchen neben $G\alpha_q$ auch $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15}$ gehören) aktivieren die Phospholipase C β (PLC β), die durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) die Signalmoleküle Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) produziert (McCudden *et al.*, 2004). IP $_3$ erhöht über die Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum die Konzentration an Calcium-Ionen im Cytoplasma, während DAG in der Plasmamembran verbleibt und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Mizuno und Itoh, 2009). Mitglieder der $G_{12/13}$ -Familie regulieren hingegen die Aktivität von RhoGEFs (*RhoGTPase Nucleotide Exchange Factors*), welche wiederum die GTPase RhoA aktivieren, die unter anderem für die Regulation des Cytoskeletts von Bedeutung ist (Kozasa *et al.*, 2011). Abbildung 1.4 fasst die ersten Schritte in der Signalkaskade der vier G-Protein-Klassen zusammen.

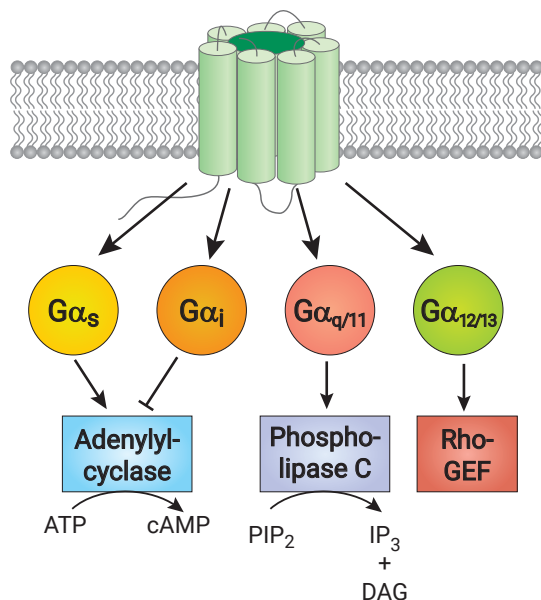


Abbildung 1.4 | Die vier G-Protein-Familien und ihre wichtigsten Effektoren

Dargestellt sind die vier Klassen der $G\alpha$ -Proteine und die ersten Schritte der von ihnen aktivierten Signalkaskaden. Alle Abkürzungen werden im Text erklärt.

Da jeder Rezeptor nur bestimmte Agonisten und G-Proteine binden kann sowie oft nur in bestimmten Zelltypen exprimiert wird, kann trotz der Vielzahl unterschiedlicher Reize jede Zelle spezifisch auf biologische Signale reagieren (Apostalokou *et al.*, 2019). Da von einigen Rezeptoren inzwischen bekannt ist, dass sie bereits durch sehr niedrige Ligandenkonzentrationen der

Liganden im atto- oder femtomolaren Bereich aktiviert werden können, besteht zudem eine hohe Sensitivität gegenüber diesen Signalmolekülen (Civciristov und Halls, 2018), die durch die Amplifikation des Signals durch die beschriebenen Enzymkaskaden verstärkt wird.

1.1.4 | Abschaltung der Signaltransduktion

Auch wenn die Signaltransduktion durch GPCRs auf zellulärer Ebene eine große Rolle spielt, kann die permanente Aktivierung dieser Enzymkaskaden verheerende Konsequenzen wie die Entstehung von Tumoren nach sich ziehen (Marinissen und Gutkind, 2001). Die Dauer eines solchen Signals muss daher streng reguliert werden, um einer Überstimulation vorzubeugen. Aus diesem Grund kann es auch bei kontinuierlicher Präsenz des Agonisten zu einer schnellen Abschwächung des Signals kommen. Neben der Inaktivierung des G-Proteins durch die Hydrolyse von GTP (vgl. Kap. 1.1.3), was durch verschiedene RGS-Proteine (*Regulators of G protein signaling*) beschleunigt werden kann (O'Brien *et al.*, 2019), sorgt auch die sogenannte Desensibilisierung der Rezeptoren für die Beendigung des Signals (Hausdorff *et al.*, 1990). Hierbei werden zwei Arten unterschieden: Die heterologe Desensibilisierung wird durch Effektorkinasen wie z.B. die PKA vermittelt und betrifft neben den eigentlichen aktivierten Rezeptoren auch inaktive GPCRs, weshalb diese Form der Desensibilisierung als unspezifisch angesehen wird (Lohse, 1993). Homologe Desensibilisierung bezieht sich dagegen nur auf die agonistaktivierten Rezeptoren und wird durch GPCR-Kinasen (GRKs) ausgelöst, welche spezifisch GPCRs in ihrer aktiven Konformation erkennen und phosphorylieren können (Ferguson *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung der Rezeptoren erfolgt überwiegend an Serin- oder Threoninresten des C-Terminus, aber auch an anderen intrazellulären Bereichen des Rezeptors wie vor allem im ICL3 (Yang *et al.*, 2017) und vermittelt die Bindung von Arrestinen. Diese erkennen spezifisch aktive, phosphorylierte Rezeptoren (Krasel *et al.*, 2005) und schalten als negative Regulatoren das G-Protein-Signal ab (siehe Abb. 1.5, ausführlich erläutert in Kap. 1.2).

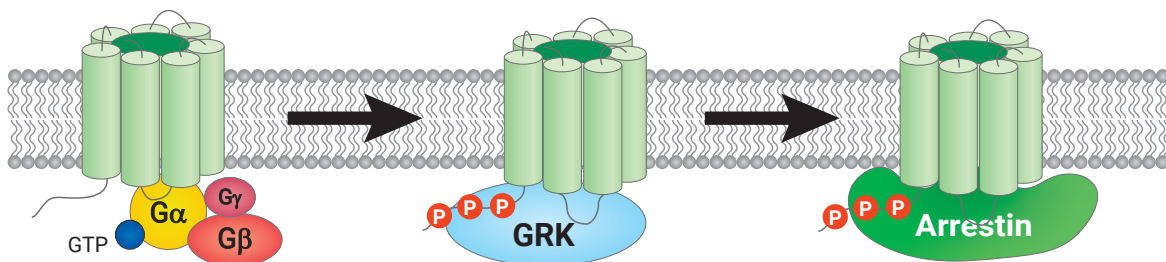


Abbildung 1.5 | Zweistufige Abschaltung des G-Protein-Signals durch GRK und Arrestin

Nach der Aktivierung des Rezeptors und der Anschaltung von G-Protein-abhängigen Signalkaskaden werden GRKs zum Rezeptor rekrutiert, die dessen C-Terminus oder intrazelluläre Schleifen phosphorylieren. Arrestin bindet anschließend spezifisch an den phosphorylierten, aktiven Rezeptor und verhindert so eine weitere Interaktion des GPCRs mit G-Proteinen.

Neben der Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor und der damit verbundenen Beendigung des G-Protein-Signals vermitteln Arrestine auch die Internalisierung der membranständigen GPCRs, die somit nicht mehr durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden können. Durch vermehrte lysosomale Degradation vorhandener GPCRs sowie eine verminderte Synthese neuer Rezeptoren kann zudem die Gesamtmenge der GPCRs herunterreguliert werden (Ferguson, 2007). Dieser Mechanismus, der die Zelle vor einer gefährlichen Überstimulation bewahrt, ist im Fall einer Arzneimittelanwendung jedoch meist unerwünscht, da hierdurch die therapeutische Wirksamkeit von Rezeptoragonisten limitiert wird.

1.1.5 | In dieser Arbeit verwendete GPCRs

Der β_2 AR und seine Varianten β_2V_2R und β_2AR -SSS

Der β_2 -adrenerge Rezeptor (β_2 AR) ist Teil der Familie der Adrenozeptoren, zu denen neben den β -adrenergen Rezeptoren auch α -adrenerge Rezeptoren gehören. Sie alle werden durch Katecholamine, insbesondere Adrenalin und Noradrenalin, aktiviert und sind besonders wichtig in sympathisch innerviertem Gewebe, kommen aber auch im zentralen und peripheren Nervensystem vor (Molinoff *et al.*, 1984). Der β_2 AR ist hierbei der am häufigsten in der Peripherie zu findende Rezeptor und vor allem in glatter Muskulatur wie in den Bronchien, im Gastrointestinaltrakt oder in den Blutgefäßen der dominant vorkommende β -Adrenozeptor. Die Aktivierung des G_s -gekoppelten Rezeptors führt zur Relaxierung des glatten Muskelgewebes und damit zu einer Erweiterung der Organe (Delmotte *et al.*, 2010). Daneben vermittelt er unter anderem die Lipolyse in weißem Fettgewebe (Large *et al.*, 1997) oder die Insulinsekretion aus dem Pankreas (Santulli *et al.*, 2012).

Der β_2 AR gehört zur Familie der Rhodopsin-artigen Rezeptoren und war nach Rhodopsin auch der erste GPCR, dessen Kristallisation und Strukturauflösung gelang (Cherezov *et al.*, 2007, Rasmussen *et al.*, 2007, Rosenbaum *et al.*, 2007). Außerdem war er der prototypische Rezeptor für die Untersuchung der Desensibilisierung, Internalisierung und Herunterregulation von GPCRs (Bylund, 2007). So wurde auch festgestellt, dass der β_2 AR nach seiner Stimulation alleine in die Zelle internalisiert wird, während der V_2R zusammen mit β -Arrestin in Endosomen lokalisiert (Oakley *et al.*, 1999). Auf Basis dieser Erkenntnis wurden GPCRs später nach ihrem Migrationsverhalten mit Arrestin klassifiziert, wobei Klasse-A-Rezeptoren wie der β_2 AR nur eine transiente Interaktion mit Arrestinen zeigen und ohne diese internalisieren, wohingegen Klasse-B-Rezeptoren zusammen mit Arrestin in endozytotische Vesikel transportiert werden (Zhang *et al.*, 1999, Oakley *et al.*, 2000) (ausführlich erläutert in Kapitel 1.2.2).

Im Zuge dieser Experimente wurde ebenfalls festgestellt, dass die Modifikation des C-Terminus der Rezeptoren das Internalisierungsverhalten mit Arrestin beeinflussen und ändern kann. Durch den kompletten Austausch des C-Terminus des β_2 AR mit dem des V_2R entstand der sogenannte β_2V_2R , welcher mit Arrestinen in Endosomen transportiert wurde, also Klasse-B-Verhalten

zeigte (Oakley *et al.*, 1999). Dieser chimäre Rezeptor, der weiterhin die pharmakologischen Eigenschaften des β_2 AR besitzt, aber trotzdem starke Interaktionen mit Arrestinen eingeht, findet seit-her ebenfalls eine breite Anwendung in der Forschung (Shukla *et al.*, 2014, Thomsen *et al.*, 2016).

Dass eine derartig große Veränderung des β_2 AR jedoch gar nicht nötig ist, um eine stärkere Interaktion sowie die Co-Internalisierung des Rezeptors mit Arrestin zu erreichen, wurde durch Zindel *et al.* (2015) belegt. Sie klonierten durch die Einführung von drei zusätzlichen Serinen (S) im C-Terminus, die als Phosphorylierungsstellen dienen, den β_2 AR-SSS, der sich ebenfalls wie ein Klasse-B-Rezeptor verhält.

Der PTH-Rezeptor (PTHR)

Im menschlichen Körper gibt es zwei Parathyroidhormon-Rezeptoren, PTHR1 und PTHR2, wobei der PTHR2 jedoch nicht in erster Linie durch das Parathyroidhormon (PTH, auch Parathormon oder Parathyrin) aktiviert wird, sondern durch das tuberoinfundibuläre Peptid TIP39. Er kommt hauptsächlich im Gehirn und im Pankreas vor und übt vorwiegend neuroendokrine Funktionen aus (Dobolyi *et al.*, 2012). Der PTHR1 wird hingegen in verschiedenen Geweben exprimiert und von zwei endogenen Liganden aktiviert, nämlich durch PTH sowie das PTH-related peptide PTHrP. Da in dieser Arbeit ausschließlich der PTHR1 verwendet wurde, wird dieser Rezeptor hier als PTHR bezeichnet und seine Eigenschaften und Funktionen im Folgenden kurz erläutert.

Der PTHR gehört zu den Sekretin-artigen GPCRs und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Phosphat- und Calciumhaushalts. Das Parathormon ist ein 84 Aminosäuren langes Peptid, welches in den Hauptzellen der Nebenschilddrüsen (lat. *Glandulae parathyroideae*) gebildet und bei sinkendem Calciumgehalt des Blutes sezerniert wird (Gardella und Vilardaga, 2015). In den Tubuluszellen der Niere löst PTH eine gesteigerte Resorption von Calciumionen bei einer gleichzeitigen verstärkten Ausscheidung von Phosphationen aus, die hauptsächlich als Gegenionen für Calcium fungieren, und sorgt so dafür, dass Ca^{2+} in freier Form vorliegt. Durch die Stimulation der Synthese von Calcitriol in der Niere wird außerdem die Resorption von Calcium aus dem Gastrointestinaltrakt erhöht (Bergwitz und Jüppner, 2010). In Knochenzellen kann PTH dagegen sowohl anabole als auch katabole Effekte vermitteln, was vor allem durch die Art der PTH-Applikation bestimmt wird. Die anhaltende Stimulation mit PTH führt zur Reifung und Aktivierung der knochenresorbierenden Osteoklasten und damit zur Freisetzung von Calcium- und Phosphationen aus dem Knochengewebe (O'Brien *et al.*, 2013). Eine intermittierende Gabe geringerer PTH-Dosen führt jedoch zum Aufbau von Knochengewebe (Silva *et al.*, 2011), was vermutlich auf einer verstärkten Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten beruht (Datta und Abou-Samra, 2009).

Von den 84 Aminosäuren des Parathormons sind nur die ersten 34 nötig, um die volle biologische Aktivität zu vermitteln (Potts *et al.*, 1971). Die verkürzte Version PTH 1-34 wird nicht nur zu Forschungszwecken eingesetzt, sondern mit dem Wirkstoffnamen Teriparatid auch zur Therapie der Osteoporose genutzt (Bilezikian *et al.*, 2005).

Die Aktivierung des PTHR mit niedrigen Agonistkonzentrationen führt zu einer G_s -vermittelten Synthese von cAMP (Bringhurst *et al.*, 1993), wohingegen der Rezeptor nach Stimulation mit hohen Konzentrationen im mikromolaren Bereich auch G_q -Proteine aktiviert und so zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Daneben aktiviert der PTHR weitere Signalwege über $G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteine (Singh *et al.*, 2005) oder Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) (Syme *et al.*, 2005).

Nach der Stimulation des PTHR wird dessen C-Terminus phosphoryliert, was zu einer robusten Rekrutierung von Arrestinen führt und in der Co-Internalisierung der beiden Proteine resultiert. Der PTHR gehört nach der Einteilung von GPCRs anhand ihres Internalisierungsverhaltens mit Arrestin also ebenfalls zur Klasse B (Zindel *et al.*, 2016).

Der Angiotensin-1-Rezeptor (AT_1R)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist in vielfältige physiologische Funktionen involviert, die unter anderem die Vasokonstriktion oder den Flüssigkeitshaushalt regulieren. Das kurze Peptidhormon Angiotensin II (AT II), welches Teil dieses Regelkreises ist, besteht aus acht Aminosäuren und aktiviert die beiden Angiotensin-Rezeptoren AT_1R und AT_2R . Der AT_1R ist von den beiden GPCRs besser charakterisiert und wird hauptsächlich im Gefäßsystem, der Niere und im Herzen exprimiert (Allen *et al.*, 2000), wo durch seine Aktivierung in erster Linie vasokonstriktorische Effekte hervorgerufen werden. Zudem stimuliert AT II die Freisetzung von Aldosteron oder Adrenalin aus der Nebenniere bzw. die Sekretion von Vasopressin aus der Hypophyse (Mulrow, 1999, Nakamura *et al.*, 2014). Die chronische Stimulation oder Überexpression kardialer AT_1R kann außerdem zur Hypertrophie und Fibrosierung des Herzens führen (Paradis *et al.*, 1999).

Nach Stimulation des AT_1R wird über G_q -Proteine die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern ausgelöst, was in Glattmuskelzellen, z.B. in den Gefäßwänden, zu einer Kontraktion und damit zur Konstriktion des Organs führt. Auch andere G-Proteine wie $G_{i/o}$ oder $G_{12/13}$ können in geringerem Ausmaß durch den AT_1R aktiviert werden (Hunyady und Catt, 2006). Der AT_1R bildet außerdem stabile Komplexe mit Arrestinen, welche gemeinsam in Endosomen transportiert werden und gehört somit zur Klasse B (Oakley *et al.*, 2000).

Der Vasopressin-2-Rezeptor (V_2R)

Der Vasopressin-2-Rezeptor ist ein G_s -gekoppelter Rezeptor, der hauptsächlich im distalen Tubulus und den Sammelrohren der Niere exprimiert wird und dort an der Regulation des Flüssigkeitshaushalts beteiligt ist. Der G_s -vermittelte Anstieg der cAMP-Produktion führt zum Einbau von Aquaporinen in die luminale Plasmamembran, was deren Wasserpermeabilität erhöht und so die Resorption von Wasser aus Primärharn fördert (Nedvetsky *et al.*, 2009). Des Weiteren kommt der V_2R unter anderem im Gefäßendothel vor, wo dessen Aktivierung zur Freisetzung des von-Willebrand-Faktors und des Gerinnungsfaktors VIII führt (Kaufmann *et al.*, 2000).

Der V_2R gehört zu den prototypischen Klasse-B-Rezeptoren (Oakley *et al.*, 2000) und sein C-Terminus wird vor allem dazu eingesetzt, chimäre Rezeptoren zu klonieren, die Klasse-A- in Klasse-B-Rezeptoren umwandeln bzw. die Affinität von Klasse-A-Rezeptoren zu Arrestinen deutlich erhöhen (wie z.B. beim β_2V_2R) (Oakley *et al.*, 1999, Dogra *et al.*, 2016, Staus *et al.*, 2020). Ein vollständig phosphoryliertes Peptid des V_2R -C-Terminus (V_2Rpp) kann dafür genutzt werden, Arrestin in seine vollständig aktivierte Konformation zu überführen (Nobles *et al.*, 2007) und wurde beispielsweise auch verwendet, um eine aktive Kristallstruktur von β -Arrestin-1 (Arrestin-2) aufzulösen (Shukla *et al.*, 2013).

Der Neurotensin-1-Rezeptor (NTSR1)

Das Peptid Neurotensin wird im Zentralnervensystem sowie in enteroendokrinen Zellen des Dünndarms synthetisiert und moduliert über die Aktivierung der Rezeptoren NTSR1, NTSR2 und NTSR3 im Gehirn das dopaminerge System oder die Freisetzung von Hormonen aus der Adenohypophyse und ist an einer Reihe weiterer Funktionen wie der Analgesie, der Blutdruckregulation oder der Hypothermie beteiligt (Tyler-McMahon *et al.*, 2000). Im Magen-Darm-Trakt wirkt es an der Regulation von verschiedenen Verdauungsvorgängen wie des Lipidmetabolismus, der Darmbewegung und intestinalen Entzündungsvorgängen mit (Kalafatakis und Trantafyllu, 2011). Die meisten Effekte werden durch den NTSR1 vermittelt, der in erster Linie G_q -Proteine aktiviert, in geringerem Ausmaß jedoch auch an G_s -, $G_{i/o}$ - und $G_{12/13}$ -Proteine koppelt (Besserer-Offroy *et al.*, 2017). Auch von diesem Rezeptor ist bekannt, dass er starke Interaktionen mit Arrestinen eingeht und nach seiner Aktivierung gemeinsam mit diesen in Endosomen internalisiert wird (Oakley *et al.*, 2000). Auch eine Kristallstruktur des NTSR1 zusammen mit trunkiertem β -Arrestin-1 (Arrestin-2) konnte bereits aufgelöst werden, wobei interessanterweise das Arrestin im Vergleich zu einer Kristallstruktur des Rhodopsin-Arrestin-1-Komplexes relativ zum Rezeptor um etwa 85° verdreht ist (Huang *et al.*, 2020).

Der Prostaglandin- E_2 -Rezeptor 4 (EP4)

Der Prostaglandin- E_2 -Rezeptor 4 vermittelt überwiegend antiinflammatorische, antithrombotische und vasoprotektive Effekte, ist jedoch auch an der Entstehung von Tumoren beteiligt, was unter anderem auf einer verstärkten Angiogenese beruht (Konya *et al.*, 2013). Außerdem spielt der EP4-Rezeptor eine wichtige Rolle beim pränatalen Offenhalten des Ductus arteriosus (Leonhardt *et al.*, 2003). Nach Stimulation des Rezeptors mit Prostaglandin- E_2 (PGE_2) aktiviert der EP4-Rezeptor G_s -Proteine, die nachfolgend zu einer Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel führen (Coleman *et al.*, 1994). Bei der systematischen Untersuchung verschiedener GPCRs in unserem Labor wurde festgestellt, dass auch der EP4 gemeinsam mit Arrestin in die Zelle internalisiert wird und deshalb der Klasse B angehört.

Der μ -Opioidrezeptor (μ OR)

Opioidrezeptoren gehören zu einer Gruppe inhibitorischer GPCRs, die durch Opiode aktiviert werden. Neben den κ - und δ -Opioidrezeptoren ist der μ -Opioidrezeptor (μ OR) das prominenteste Mitglied dieser Familie, die vor allem durch ihre Beteiligung an analgetischen Prozessen bekannt ist. Als endogene Agonisten dieser GPCRs dienen Endorphine, Enkephaline und Dynorphine (Dhawan *et al.*, 1996), doch es gibt eine Fülle weiterer Liganden natürlichen oder synthetischen Ursprungs wie z.B. das für den μ OR namensgebende Alkaloid Morphin, das primäre psychoaktive Alkaloid aus dem getrockneten Milchsafte (Opium) des Schlafmohns (*Papaver somniferum*). Auch wenn die Opiode aufgrund ihrer breiten Anwendung in der Therapie mittelstarker bis starker Schmerzen eine große Bedeutung für die Schulmedizin haben, besitzen sie auch ihre Schattenseiten, denn aufgrund ihrer euphorisierenden Wirkung spielen sie auch im Substanzmissbrauch eine große Rolle.

Die Stimulation des μ OR, der hauptsächlich im Zentralnervensystem zu finden ist, führt zur Aktivierung von $G_{i/o}$ -Proteinen und damit zur Inhibierung der Adenylylcyclase sowie über $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zur präsynaptischen Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms (Tedford und Zamponi, 2006) und zur postsynaptischen Aktivierung von GIRK-Kanälen, die für einen vermehrten Kaliumausstrom aus der Zelle sorgen (Lüscher und Slesinger, 2010). Diese Effekte auf die Elektrolytströme bewirken zum einen eine reduzierte Freisetzung von Neurotransmittern aus chemischen Synapsen und zum anderen die Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran, was beides die Weiterleitung von Signalen über die Neuronen erschwert (Law *et al.*, 2000).

Wie die meisten anderen GPCRs wird auch der μ OR nach seiner Aktivierung phosphoryliert, um das G-Protein-Signal abzuschalten. Das dabei entstehende Phosphorylierungsmuster an verschiedenen Serin- und Threoninresten des C-Terminus ist jedoch variabel und abhängig vom verwendeten Agonisten (Mann *et al.*, 2014). Dies kommt durch die unterschiedliche Aktivierung verschiedener GRKs zustande und resultiert auch in einer verschieden starken, ligandenabhängigen Arrestin-Rekrutierung (McPherson *et al.*, 2010). Der μ OR gehört nach der Einteilung der GPCRs anhand ihres Internalisierungsverhaltens mit Arrestinen zu den Klasse-A-Rezeptoren, internalisiert also ohne Arrestin in Endosomen (Oakley *et al.*, 2000).

1.2 | Arrestin

1.2.1 | Entdeckung und Grundstruktur der Arrestine

Wie bereits angesprochen wurde, interagieren GPCRs nicht nur mit G-Proteinen, sondern auch mit weiteren wichtigen Gruppen regulatorischer Proteine wie den Arrestinen. Diese Proteinfamilie umfasst in Säugetieren vier homologe Proteine, zu denen zum einen die visuellen Arrestine Arrestin-1 und Arrestin-4 gehören, die in den Zapfen- und Stäbchenzellen der Retina exprimiert werden und dort die Aktivität des photosensitiven GPCRs Rhodopsin regulieren (Gurevich *et al.*, 2011). Die beiden nicht-visuellen Arrestine Arrestin-2 und Arrestin-3 hingegen kommen in fast jedem Zelltyp vor und können mit einer großen Menge an GPCRs interagieren (Lefkowitz und Whalen, 2004). Arrestin wurde zuerst als Bestandteil des visuellen Systems beschrieben und bekam seinen Namen aufgrund der signalabschaltenden Wirkung (engl. *to arrest* = anhalten, stoppen) (Wilden *et al.*, 1986). Wenig später wurden auch die beiden nicht-visuellen Arrestin-Isoformen als negative Regulatoren des β_2 -adrenergen Rezeptors entdeckt, weshalb sie auch als β -Arrestine (Arrestin-2 = β -Arrestin-1, Arrestin-3 = β -Arrestin-2) bezeichnet werden (Lohse *et al.*, 1990, Attramadal *et al.*, 1992). In den folgenden Jahren wurden immer mehr GPCRs als Interaktionspartner der β -Arrestine beschrieben (Barak *et al.*, 1997) und heute ist bekannt, dass sie nicht nur an eine Vielzahl dieser Rezeptoren, sondern auch andere Proteine binden können und so eine große Anzahl verschiedener Funktionen erfüllen, zu der neben der bekannten Rolle in der Desensibilisierung von GPCRs unter anderem die Internalisierung der Rezeptoren sowie die Regulation weiterer Signalmoleküle wie Mitogen-aktivierten Proteinkinasen gehört (Smith und Rajagopal, 2016).

Die Strukturen aller vier Arrestin-Isoformen zeigen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit im Aufbau mit zwei konkaven Bereichen, der N- und C-Domäne aus jeweils mehreren antiparallelen β -Faltblättern, die durch eine kurze Gelenkregion miteinander verbunden sind (Lohse & Hoffmann, 2013). In der inaktiven Konformation ist der lange C-Terminus an die N-Domäne des Proteins gebunden, wo er z.B. im sogenannten „polar core“ des Proteins durch ionische Wechselwirkungen mit der N-Domäne und dem Gate loop interagiert und dadurch diesen inaktiven Zustand stabilisiert. Auch die hydrophobe „Three-element-interaction“ zwischen dem C-Terminus und verschiedenen Strukturen der N-Domäne hilft, den C-Terminus in der N-Domäne zu fixieren (Abb. 1.6). Dass dies wich-

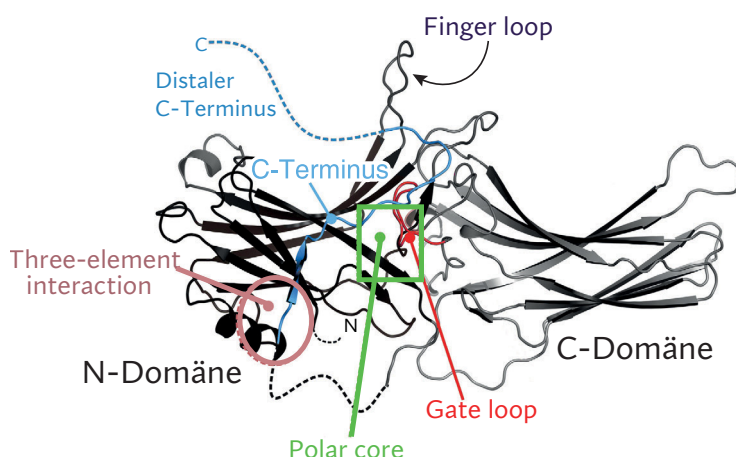


Abbildung 1.6 | Inaktive Struktur von Arrestin-1

Alle im Text erwähnten Strukturen des Arrestins sind farbig hervorgehoben. (Abbildung verändert nach Scheerer und Sommer, 2017.)

teins gebunden, wo er z.B. im sogenannten „polar core“ des Proteins durch ionische Wechselwirkungen mit der N-Domäne und dem Gate loop interagiert und dadurch diesen inaktiven Zustand stabilisiert. Auch die hydrophobe „Three-element-interaction“ zwischen dem C-Terminus und verschiedenen Strukturen der N-Domäne hilft, den C-Terminus in der N-Domäne zu fixieren (Abb. 1.6). Dass dies wich-

tig ist, um Arrestin in der inaktiven Konformation zu halten, wurde schon früh durch Experimente mit der natürlich vorkommenden Spleißvariante p44, bei der der C-Terminus von Arrestin-1 fehlt, festgestellt (Smith *et al.*, 1994). Durch die fehlende Stabilisierung der inaktiven Konformation kann p44 leichter aktiviert werden und ist dadurch auch in der Lage, an nicht-phosphoryliertes Rhodopsin zu binden (Pulvermüller *et al.*, 1997). Auch Mutationen des „polar core“, bei der die Ladungen der beteiligten Aminosäuren, vor allem R175 und D296 in Arrestin-1 (R170 in Arrestin-3), ausgetauscht wurden, führten zu Arrestin-Varianten, die in einem präaktivierten Zustand vorlagen und weniger stark auf die Phosphorylierung des Rezeptors angewiesen waren (Raman *et al.*, 2003, Ostermaier *et al.*, 2014).

Ein phosphorylierter C-Terminus eines GPCRs kann die Wechselwirkungen des Arrestin-C-Terminus mit der N-Domäne aufbrechen und den Platz des Arrestin-C-Terminus einnehmen („C-terminal swap“). Hierbei wird das „Polar core“ aufgebrochen, sodass die negativ geladenen Aminosäuren D296 und D302, die sich auf dem sogenannten „Gate loop“ befinden, dafür sorgen, dass sich diese Schleife von mehreren positiv geladenen Aminosäuren in der N-Domäne des Arrestins wegbewegt. Hierdurch werden diese für die Bindung des phosphorylierten C-Terminus zugänglich gemacht (Shukla *et al.*, 2013). Bei der Aktivierung Arrestins kommt es zudem zu einer Umordnung der C- und N-Domänen, die sich bei diesem Vorgang um ca. 20 ° relativ zueinander drehen (Scheerer und Sommer, 2017). Auch weitere Schleifen wie der „Finger loop“, die sich zwischen der C- und N-Domäne befinden, ändern ihre Konformation (Scheerer und Sommer, 2017) (vgl. Abb. 1.7).

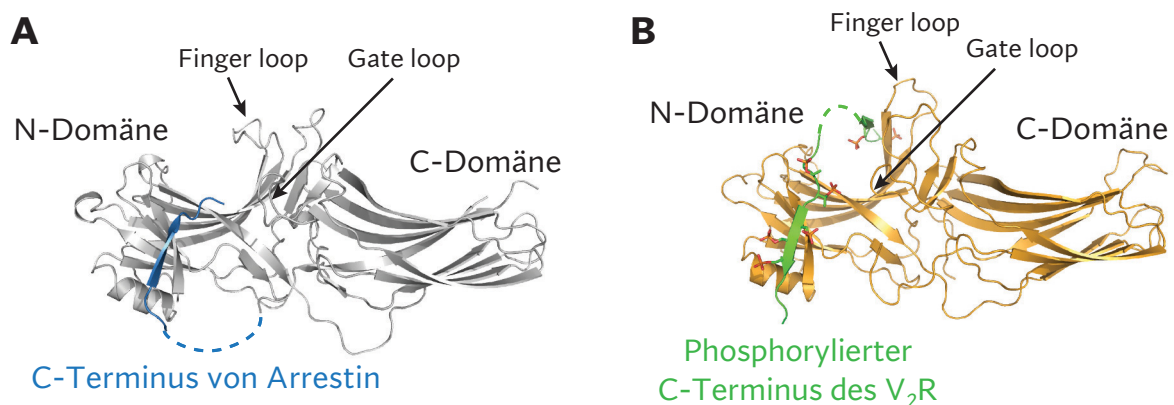


Abbildung 1.7 | Vergleich der Kristallstrukturen von Arrestin-2 in basaler und aktiver Konformation

A Struktur von inaktivem Arrestin-2 (β -Arrestin-1) mit dem autoinhibitorischen C-Terminus, der in dieser Konformation mit der N-Domäne des Arrestins interagiert (blau).

B Struktur von aktivem Arrestin-2 mit dem phosphorylierten C-Terminus des V_2R (V_2Rpp) (grün), der den Platz des Arrestin-C-Terminus eingenommen hat. Zu sehen sind außerdem die Umordnung der Schleifen zwischen N- und C-Domäne, die an der Rezeptorinteraktion beteiligt sind (z.B. *Finger loop*) und die Rotation der beiden Domänen relativ zueinander. (Abbildung verändert nach Erlandson *et al.*, 2018.)

Bei der Bindung des Arrestins an den phosphorylierten C-Terminus eines GPCRs interagieren dessen negativ geladene Phosphatreste mit positiven Aminosäuren in der Arrestin-N-Domäne. Je mehr positive Aminosäuren des Arrestins dabei in Wechselwirkung mit dem Rezeptor treten bzw. je besser der Abstand der Phosphatreste im Rezeptor-C-Terminus an die Anordnung der posi-

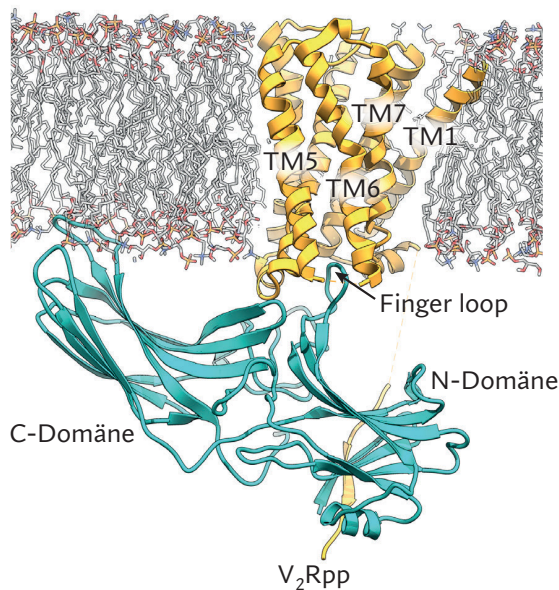


Abbildung 1.8 | Cryo-EM-Struktur von Arrestin-2 im Komplex mit dem M₂R

Zur Strukturauflösung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes wurde der C-Terminus des M₂R mit dem vollständig phosphorylierten C-Terminus des V₂R (V₂Rpp) ausgetauscht. (Abbildung verändert nach Staus *et al.*, 2020.)

tiv geladenen Taschen in der Oberfläche Arrestins angepasst ist, desto besser und stärker kann Arrestin an den Rezeptor binden (Zhou *et al.*, 2017, Mayer *et al.*, 2019). Ist der Rezeptor zusätzlich aktiviert, kann Arrestin mit seiner konkaven Seite an den GPCR binden, wobei der sogenannte „Finger loop“ mit dem intrahelikalen Bereich des Rezeptors interagiert (Abb. 1.8).

Dies führte zu der Annahme, dass für die Bindung Arrestins an den Rezeptor zuerst die Phosphorylierung des GPCRs überprüft wird und ein weiterer Bereich des Arrestins daraufhin als "Aktivierungssensor" die aktive Konformation des Rezeptors erkennt. Nur wenn diese beiden Voraussetzungen gleichzeitig erfüllt sind, bilden die beiden Proteine einen stabilen Komplex. Mithilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen einzelner Rezeptor-Arrestin-Komplexe konnten zwei verschiedene Konformationen der Arrestinbindung identifiziert werden, von denen angenommen wird, dass sie getrennte Schritte im Bindungsprozess von Arrestin an den Rezeptor repräsentieren (Shukla *et al.*, 2014). In der einen Konformation scheint Arrestin nur über eine Stelle an den Rezeptor zu binden, was vermutlich der Interaktion mit dem phosphorylierten C-Terminus entspricht. Diese Anordnung der beiden Proteine wird daher auch als hängende oder "tail"-Konformation bezeichnet (Abb. 1.9 oben). In anderen Komplexen interagiert Arrestin über

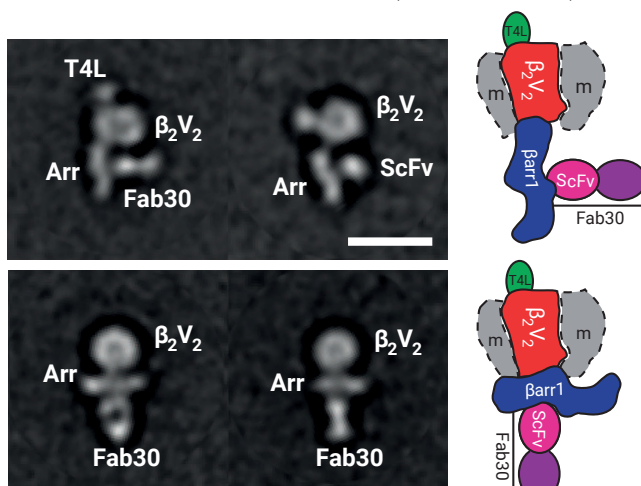


Abbildung 1.9 | Hängende und feste Konformation des Arrestin-Rezeptor-Komplexes

Der Komplex aus β₂V₂R und β-Arrestin-1 und weiteren stabilisierenden Proteinen (T4L, Fab30/ScFv30) in einer Mizelle (m) wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Die Komplexe ließen sich entweder als hängende (oben) oder feste Konformation (unten) einordnen. Aus den Aufnahmen wurden schematische Darstellungen der beiden Konformationen entwickelt (rechts). Der Maßstab entspricht 10 nm. (Abbildung verändert nach Shukla *et al.*, 2014.)

einen größeren Bereich, der vermutlich den Schleifen zwischen N- und C-Domäne entspricht, mit dem Rezeptor (Abb. 1.9 unten). Da in diesem Fall die Bindung des Arrestins an den Rezeptor deutlich stabiler erscheint, wird dies auch als feste (engl. *tight*) Konformation beschrieben (Shukla *et al.*, 2014).

Angeichts der vielfältigen Funktionen von Arrestin (siehe auch Kap. 1.2.2 und 1.2.3) wurde später herausgefunden, dass die Interaktion mit GPCRs in der hängenden Konformation ausreicht, um beispielsweise die Internalisierung des Komplexes auszulösen oder Arrestin-induzierte Signalwege anzuschalten. Zur Desensibilisierung des G-Protein-Signals hingegen ist die Interaktion von Arrestin über seinen *Finger loop* mit den Transmembranhelices des GPCRs zwingend nötig (Cahill *et al.*, 2016, Kumari *et al.*, 2017). Durch diese konformationelle Anordnung von Arrestin am Rezeptor wird der intrazelluläre Teil des GPCRs bedeckt, sodass dieser keine weiteren G-Proteine mehr aktivieren kann und es zur Beendigung des Signals kommt (vgl. Abb. 1.8).

1.2.2 | Internalisierung von Rezeptoren

Neben der schnellen Signalabschaltung durch die Desensibilisierung von Rezeptoren spielen β -Arrestine auch eine große Rolle bei der agonistinduzierten Internalisierung von GPCRs. Typischerweise findet die Endocytose über clathrinbedeckte Stachelsaumgrübchen („*clathrin-coated pits*“, CCP) statt, es gibt jedoch auch andere, clathrinunabhängige Mechanismen für die Internalisierung von GPCRs (Marchese *et al.*, 2003). Die Rezeptoren können selbst nicht direkt mit Clathrin oder anderen Bestandteilen der CCPs interagieren und nutzen daher Arrestine, die direkt an Proteine, die den Endocytosevorgang vermitteln, binden können (Goodman *et al.*, 1996). Im C-Terminus des Arrestins, der durch die Aktivierung von der N-Domäne gelöst wurde, liegen beispielsweise die Interaktionsstellen für Clathrin und den Adapterkomplex AP-2, die beide für die nachfolgende Endocytose des Rezeptors verantwortlich sind (Krupnick *et al.*, 1997, Laporte *et al.*, 2000). In den Stachelsaumgrübchen lagern sich Clathrin-Moleküle zu einer Art Gitterstruktur zusammen, was zu einer Einstülpung der Membran führt (Hirst und Robinson, 1998). Clathrin selbst sowie der Adapterkomplex AP-2, der Clathrin mit der Membran verknüpft, können mit verschiedenen Membranproteinen interagieren und diese in den CCPs anreichern. Die GTPase Dynamin führt schließlich zur Abschnürung des sich formenden Vesikels, wodurch alle dort vorhandenen Proteine in die Zelle aufgenommen werden (Hirst und Robinson, 1998). Die Rezeptoren werden anschließend in frühen Endosomen sortiert und können entweder dephosphoryliert und anschließend wieder in die Membran zurückgebracht (Recycling) oder in Lysosomen transportiert werden, wo sie abgebaut werden (Degradation) (Marchese *et al.*, 2003) (siehe Abb. 1.10).

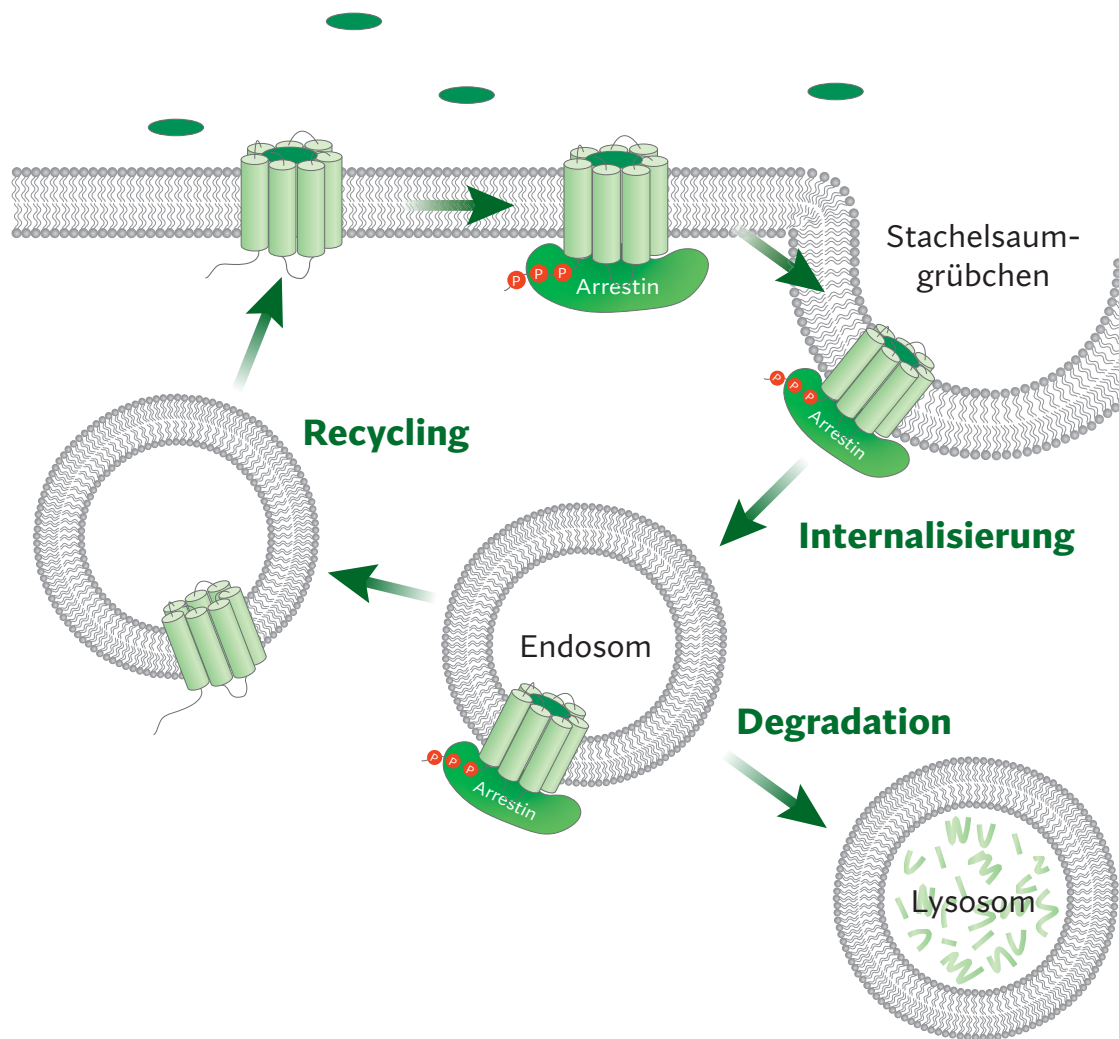


Abbildung 1.10 | Recycling oder Abbau internalisierter GPCRs

Nach der Aktivierung des Rezeptors führt die Bindung von Arrestin zur Anreicherung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes in clathrinbedeckten Stachelsaumgrübchen. Durch die Endocytose dieses Bereiches gelangt der Rezeptor in Endosomen, von wo er entweder zum Proteinabbau in Lysosomen transportiert oder in Recycling-Endosomen dephosphoryliert wird, bevor er wieder zurück an die Plasmamembran transportiert wird.

Manche Rezeptoren bilden während der Internalisierung so stabile Komplexe mit Arrestinen, dass diese gemeinsam internalisieren und beide Proteine in Endosomen zu finden sind. In anderen Fällen dissoziiert das Arrestin während des Endocytosevorgangs auf bisher unbekannte Weise vom GPCR, sodass dieser alleine in Endosomen aufgenommen wird (Zhang *et al.*, 1999). Da dies vom untersuchten Rezeptor abhängt, können GPCRs anhand ihres Internalisierungsverhaltens mit Arrestin in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Klasse-A-Rezeptoren wie beispielsweise der β_2 AR oder der μ OR interagieren nur transient mit Arrestinen, die auch nach der Internalisierung des Rezeptors noch an der Plasmamembran oder frei im Cytosol zu finden sind, während Klasse-B-Rezeptoren wie der V_2 R oder PTHR mit dem gebundenen Arrestin gemeinsam internalisiert werden und anschließend in Endosomen co-lokalisieren (Oakley *et al.*, 2000) (siehe Abb. 1.11). Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren unterscheiden sich außerdem in ihren Affinitäten für die verschiedenen Arrestin-Isoformen: Während Klasse-A-Rezeptoren eine höhere Affinität zu β -Arrestin-2 (Arrestin-3) als zu β -Arrestin-1 (Arrestin-2) zeigen und nicht mit visuellem Arrestin interagieren, können Klasse-B-Rezeptoren beide β -Arrestine gleich stark binden und auch visuelles Arrestin rekrutieren (Oakley *et al.*, 2000). Die Einteilung von GPCRs in Klasse A und Klasse B bezieht sich in dieser Arbeit immer auf die eben beschriebene Klassifizierung anhand ihres Internalisierungsverhaltens mit Arrestinen und nicht auf die Einteilung aufgrund ihres strukturellen Aufbaus. Ursprünglich wurde postuliert, dass Klasse-B-Rezeptoren nach ihrer Internalisierung meist degra-

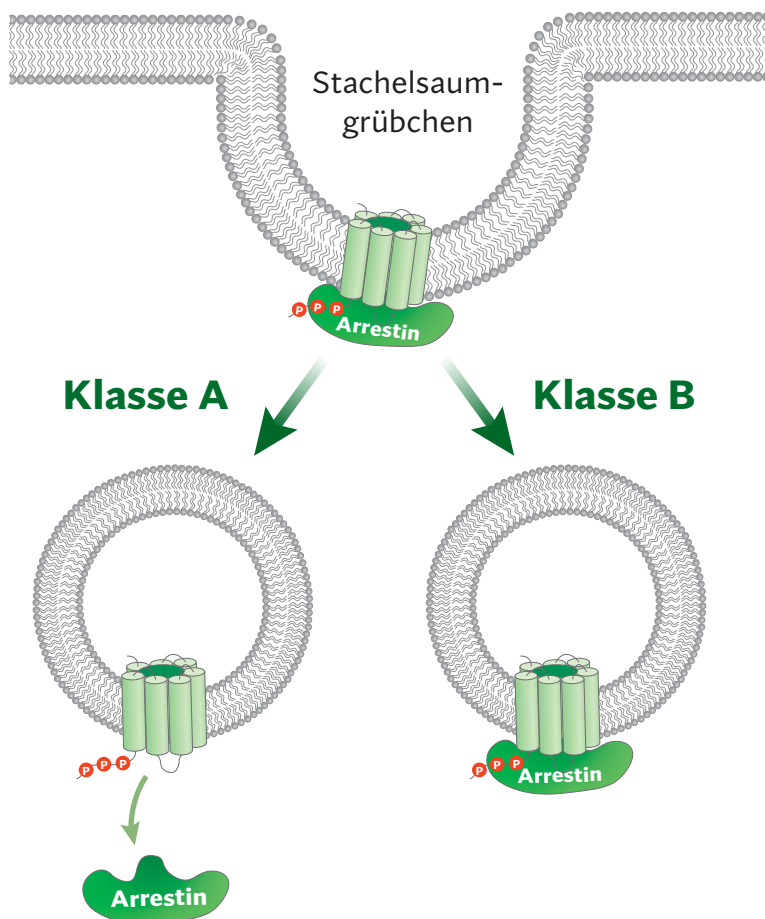


Abbildung 1.11 | Einteilung von GPCRs anhand ihres Internalisierungsverhaltens

Klasse-A-Rezeptoren zeigen nur eine transiente Interaktion mit Arrestin und lokalisieren nach ihrer Internalisierung alleine in Endosomen (links). Klasse-B-Rezeptoren hingegen bilden stabile Komplexe mit Arrestinen, die gemeinsam in Endosomen transportiert werden (rechts).

diert werden bzw. nur sehr langsam zurück an die Membran gebracht werden (Oakley *et al.*, 1999). Es gibt jedoch auch einige GPCRs, die zwar mit Arrestinen in die Zelle internalisieren, jedoch ganz normal recycelt werden (Chauvin *et al.*, 2002, Tulipano *et al.*, 2003, Zindel *et al.*, 2015).

Es wird vermutet, dass die Internalisierung von Arrestin mit Klasse-B-Rezeptoren auf der stabilen, langanhaltenden Ubiquitinierung des Arrestins beruht, die durch diese Rezeptoren induziert wird. Klasse-A-Rezeptoren führen im Gegensatz dazu nur zu einer transienten Ubiquitinierung Arrestins, die nach wenigen Minuten ein Maximum erreicht und anschließend wieder abnimmt (siehe auch Kap. 1.2.4.1).

1.2.3 | Signalweiterleitung durch β -Arrestin

β -Arrestine fungieren nicht nur als negative Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, sondern sind auch an der Aktivierung weiterer Signalkaskaden beteiligt. Die Aktivierung von GPCRs führt also nicht einfach zur Anschaltung linearer Signalketten, sondern zu einem komplexen Netzwerk aus unterschiedlichen Enzymen und *Second messengern*, die sich gegenseitig beeinflussen können und so eine fein abgestimmte Antwort auf jeden extrazellulären Reiz ergeben.

Da Arrestine selbst keine enzymatische Aktivität besitzen, besteht ihre Aufgabe hauptsächlich darin, andere Signalmoleküle zusammenzuführen und es zu ermöglichen, dass die verschiedenen Elemente des Signalkomplexes miteinander in Kontakt kommen (Bourquard *et al.*, 2015). β -Arrestine können mit einer großen Anzahl anderer Proteine interagieren (Arrestin-2 mit 71, Arrestin-3 mit 164 verschiedenen Proteinen (Xiao *et al.*, 2007)), zu denen zum Beispiel verschiedene Proteinkinasen gehören (Gurevich und Gurevich, 2006). Besonders gut erforscht ist hierbei die Aktivierung von MAPK-Signalwegen, zu denen z.B. ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*), p38 oder die c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) gehören, die vielfältige zelluläre Funktionen wie Zelldifferenzierung, Chemotaxis oder Apoptose regulieren (DeWire *et al.*, 2007). Die einzelnen MAP-Kinasen sind in einer Serie paralleler Phosphorylierungskaskaden durch verschiedene Serin- oder Threoninkaskaden organisiert.

Adapterproteine wie GPCR-aktivierte Arrestine, die die einzelnen Kinasen zu einem Signalkomplex zusammenbringen, regulieren diese Signalwege durch die Koordinierung der verschiedenen Komponenten der Enzymkaskade (Brown und Sacks, 2009). Besonders gut untersucht ist die Arrestin-vermittelte Aktivierung der ERK1/2-Kaskade, von der alle beteiligten Kinasen (c-SRC, Raf1, MEK1/2 und ERK1/2) direkt oder indirekt mit β -Arrestin interagieren können (Luttrell *et al.*, 2001, Bourquard *et al.*, 2015).

Anfangs wurde postuliert, dass die Anschaltung der MAPK-Signalwege durch Arrestine gänzlich unabhängig von der Signaltransduktion durch G-Proteine ist, der Arrestin-vermittelten ERK-Aktivierung also keine Aktivierung der G-Proteine vorausgehen muss (Rajagopal *et al.*, 2010). Knockout-Experimente konnten jedoch zeigen, dass GPCRs in Zellen ohne funktionelle G-Proteine ERK1/2 nicht aktivieren können (Grundmann *et al.*, 2018). Ein Knockout beider β -Arrestine

verhindert die Aktivierung von ERK hingegen nicht, sodass Arrestine für die GPCR-vermittelte ERK-Aktivierung im Gegensatz zu den G-Proteinen nicht zwingend nötig sind (O'Hayre *et al.*, 2017, Grundmann *et al.*, 2018). Arrestine fungieren vielmehr als Regulatoren der MAPK-Signalwege und können je nach Rezeptor dieses Signal eher verstärken (z.B. beim β_2 AR) oder abschwächen (z.B. beim β_1 AR) (Gutkind und Kostenis, 2018).

Die GPCR-vermittelte ERK-Aktivierung lässt sich zudem in zwei Wellen einteilen, von denen sich die erste Welle direkt nach der Bindung des Agonisten an den Rezeptor an der Zellmembran bildet und durch G-Proteine ausgelöst wird. Die zweite Welle geht von internalisierten GPCRs in Endosomen aus, was für eine Vermittlung dieses Signals unter Beteiligung von Arrestin spricht (Ahn *et al.*, 2004, Irannejad *et al.*, 2013, Lohse und Calebiro, 2013). Auch in ihrem räumlichen Auftreten lassen sich die beiden Wellen unterscheiden: Während die G-Protein-abhängige ERK-Aktivierung an der Zellmembran zur Translokation der Kinase in den Zellkern und damit zur Regulierung der Transkription führt sowie ein eher transientes Signal hervorruft, wird ERK1/2 nach der Aktivierung mithilfe von Arrestin durch die Bindung an das Adapter-Protein im Cytosol zurückgehalten und ist zudem länger aktiv, da die Kinase im Signalkomplex vor der Inaktivierung durch Phosphatasen geschützt wird (Tohgo *et al.*, 2003, Strungs und Luttrell, 2013).

Da G-Proteine und Arrestine also unterschiedliche Auswirkung auf die Signaltransduktion von GPCRs haben, führte dies zu der Idee, dass die beiden Signalkaskaden durch spezielle Liganden spezifisch adressiert und unabhängig vom jeweils anderen Signalweg angeschaltet werden könnten. Dieses Konzept wurde als funktionelle Selektivität oder „*Signaling Bias*“ bezeichnet und derartige Liganden bereits beschrieben, z. B. das Peptid [Sar¹, Ile⁴, Ile⁸]-Angiotensin II (SII), das nach Aktivierung des AT₁R nur Arrestin-abhängige Signale auslöst (Kendall *et al.*, 2011). Solche Liganden stabilisieren den Rezeptor vermutlich in leicht anderen Konformationen, die entweder die Aktivierung von G-Proteinen oder Arrestinen bevorzugen und dadurch die beiden Signalwege unterschiedlich stark anschalten können (Wooten *et al.*, 2018).

Auch die selektive Phosphorylierung unterschiedlicher Serin- und Threoninreste im C-Terminus des Rezeptors, die beispielsweise durch die Rekrutierung verschiedener GRK-Isoformen erreicht wird, kann dazu führen, dass die einzelnen Funktionen des Arrestins unterschiedlich stark angeschaltet werden (Nobles *et al.*, 2011). Da hierfür die Entstehung verschiedener Phosphorylierungsmuster im C-Terminus entscheidend ist, wurde hieraus die „*Barcode*“-Hypothese abgeleitet, nach der verschiedene Liganden die Phosphorylierung unterschiedlicher Positionen des Rezeptors induzieren und so zu unterschiedlichen zellulären Antworten führen (Butcher *et al.*, 2011, Nobles *et al.*, 2011). Die einzelnen Phosphatreste an unterschiedlichen Stellen des Rezeptor-C-Terminus interagieren dabei mit verschiedenen positiv geladenen Taschen in der Oberfläche des Arrestins und induzieren so unterschiedliche Arrestin-Konformationen, die wiederum verschiedene Effekte auf die Rezeptorbindung, Internalisierung und Arrestin-abhängige Signaltransduktion haben (siehe Abb. 1.12) (Lee *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2017, Latorraca *et al.*, 2020, Dwivedi-Agnihotri *et al.*, 2020).

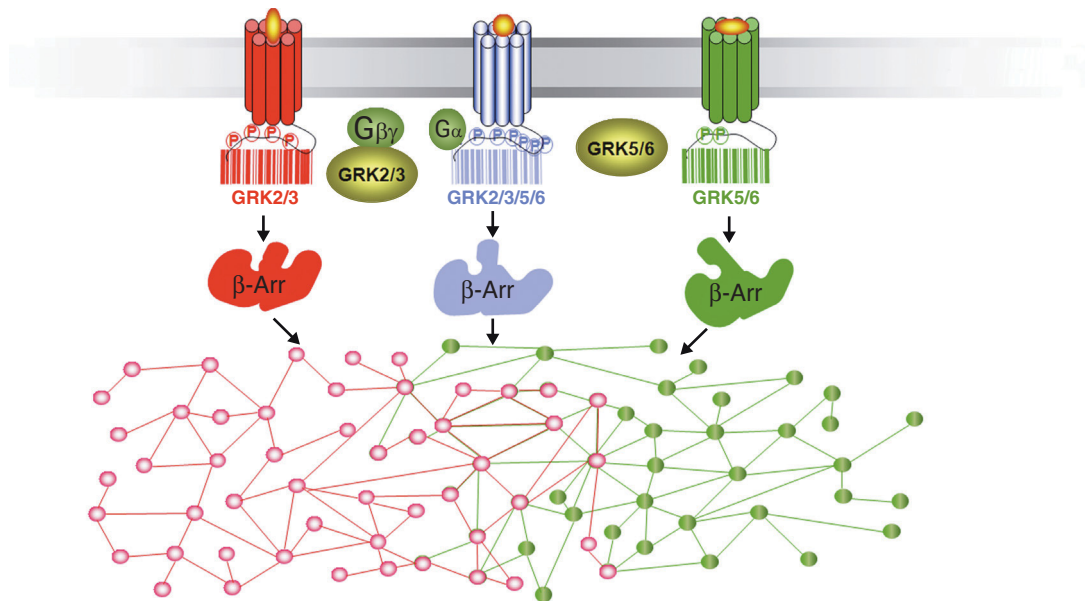


Abbildung 1.12 | Die "Barcode"-Hypothese zur Phosphorylierung von GPCRs

Funktionell selektive Liganden stabilisieren unterschiedliche aktive Konformationen des Rezeptors, die durch die Rekrutierung verschiedener GRK-Isoformen an unterschiedlichen Stellen im C-Terminus phosphoryliert werden. Die verschiedenen Phosphorylierungsmuster stabilisieren Arrestin in unterschiedlichen Konformationen, was zu einer Anschaltung unterschiedlicher Signalwege führt. (Abbildung verändert nach Wisler *et al.*, 2014.)

Da die G-Protein- oder Arrestin-induzierte Signaltransduktion unterschiedliche Auswirkungen hat, kann die Bevorzugung eines der beiden Signalwege durch verschiedene Liganden auch therapeutisch interessant sein. In vielen Fällen wird postuliert, dass einer der beiden Signalwege den gewünschten vorteilhaften Effekt hat, während der andere die unerwünschten Wirkungen vermittelt, weshalb funktionell selektive Liganden den unselektiven Wirkstoffen überlegen sein könnten (Gurevich und Gurevich, 2020). Da Arrestine zur Desensibilisierung und oft auch einer verminderten Expression dauerstimulierter GPCRs führen, sind bei der Applikation von agonistischen Wirkstoffen solche Liganden von Vorteil, die möglichst wenig Arrestin-Rekrutierung induzieren (z.B. an β -adrenergen Rezeptoren oder am μ OR) (Whalen *et al.*, 2011). In anderen Fällen hat die Aktivierung von β -Arrestinen vorteilhafte Effekte, zum Beispiel führte der AT_1R -Agonist [Sar¹, D-Ala⁸]-Angiotensin II, der hauptsächlich Arrestin aktiviert, in präklinischen Untersuchungen zu einer gesteigerten Kontraktilität von Herzmuskelzellen und damit einer verbesserten Funktion des Herzens, wohingegen Wirkstoffe, die auch G-Protein-abhängige Signalwege anschalten, die Herzleistung reduzierten (Violin *et al.*, 2010, Ryba *et al.*, 2017).

1.2.4 | Posttranslationale Modifikationen von Arrestinen

Wie viele andere Proteine werden auch β -Arrestine durch die kovalente Addition kleiner Moleküle wie Phosphatgruppen verändert. Sowohl Arrestin-2 als auch Arrestin-3 sind konstitutiv phosphoryliert (Arrestin-2 an S412, Arrestin-3 an S361 und T383 (Lin *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 2002)) und müssen zur Internalisierung von GPCRs und zur Anschaltung von MAP-Kinasen dephosphoryliert werden. Für die Desensibilisierung des G-Protein-Signals ist die Dephosphorylierung jedoch nicht notwendig (Smith und Rajagopal, 2016). In den clathrinbesetzten Stachelsaumgrübchen findet anschließend eine erneute Rephosphorylierung des Arrestins statt. Auch die S-Nitrosylierung von Arrestin-3 ist wichtig für den Endocytosevorgang. Die Nitrosylierung eines Cystein-Restes im C-Terminus des Arrestins verstärkt dessen Bindung an Clathrin oder AP-2, was die Internalisierung von GPCRs erleichtert (Ozawa *et al.*, 2008). Die S-Nitrosylierung einer weiteren Stelle in Arrestin-3 (C253) kann außerdem die Funktion des Arrestins regulieren und vermutlich durch eine Homodimerisierung von Arrestinen und die resultierende Beeinträchtigung der Bindung an Rezeptoren die Aktivierung Arrestin-abhängiger Signalwege reduzieren (Hayashi *et al.*, 2018). Weitere posttranslationale Modifikationen, die in dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielen, werden in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

1.2.4.1 | Ubiquitinierung

Ubiquitine sind kleine Proteine (8,6 kDa), die nach ihrem ubiquitären Vorkommen in allen eukaryotischen Zellen und Zelltypen benannt wurden. Die Modifikation anderer Proteine mit Ubiquitinresten beeinflusst beispielsweise ihre Stabilität, zelluläre Lokalisation, Aktivität oder die Interaktion mit weiteren Proteinen. Die Verknüpfung von Ubiquitin mit Substratproteinen findet in erster Linie zwischen der C-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitins und Lysinresten der Zielproteine statt. Es können jedoch auch ubiquitinierte Serine, Threonine, Cysteine oder N-Termini von Proteinen beobachtet werden (McClellan *et al.*, 2019). Unter den 76 Aminosäuren, aus denen

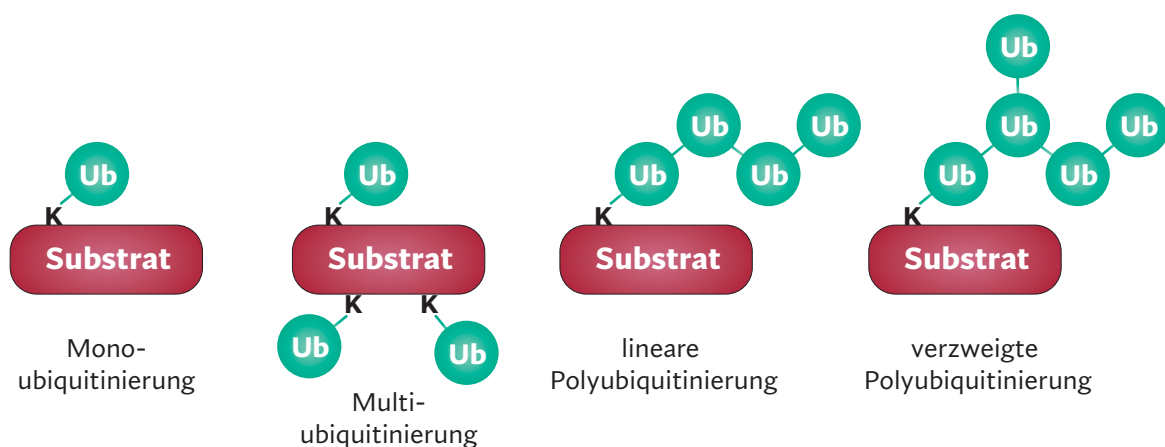


Abbildung 1.13 | Verschiedene Arten der Ubiquitinierung

Die Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen (Ub) mit Lysinresten (K) eines Substratproteins kann verschiedene Ubiquitinierungsmuster hervorrufen, die unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktionen des Substratproteins haben.

das Ubiquitin-Molekül aufgebaut ist, befinden sich sieben Lysine, die ebenfalls als Substrat für weitere Ubiquitinmodifikationen dienen können, sodass es neben Monoubiquitinierungen oft zu Ubiquitinketten mit unterschiedlicher Länge und Verzweigungen kommt (siehe Abb. 1.13).

Die Ubiquitinierung von Zielproteinen ist ein mehrstufiger Prozess, der in drei Hauptschritten von unterschiedlichen Ubiquitin-Ligasen katalysiert wird (siehe Abb. 1.14). Insgesamt codieren etwa 5 % des humanen Genoms für Proteine, die die Ubiquitinierung anderer Proteine regulieren (Deol *et al.*, 2019). Im ersten Schritt wird die Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins von Ubiquitin (G76) in einem ATP-abhängigen Vorgang mit einem Cystein im katalytischen Zentrum einer E1-Ligase verknüpft. Diese Gruppe der Ubiquitin-Ligasen, die auch als Ubiquitin-aktivierende Enzyme bezeichnet werden, umfasst im menschlichen Organismus zwei Gene, Uba1 und Uba6, von denen Uba1 für die Aktivierung von ca. 99 % aller Ubiquitinmoleküle verantwortlich ist, die später an verschiedene Zielproteine angehängt werden (Hyer *et al.*, 2018). Da Uba6 deutlich später erforscht wurde als Uba1 und nur eine untergeordnete Rolle spielt (Jin *et al.*, 2007), wird Uba1 oft auch als *Ubiquitin Activating Enzyme* (UAE) bezeichnet. Als nächstes wird das Ubiquitin-Molekül auf den Cysteinrest im katalytischen Zentrum einer E2-Ligase transferiert. Diese Gruppe der Ubiquitin-Ligasen wird auch als Ubiquitin-konjugierende Enzyme bezeichnet und besteht im Menschen aus ca. 40 verschiedenen Proteinen (Stewart *et al.*, 2016). Da jede dieser E2-Ligasen nur mit bestimmten E3-Ligasen interagieren kann, spielt diese Enzymfamilie ebenfalls eine

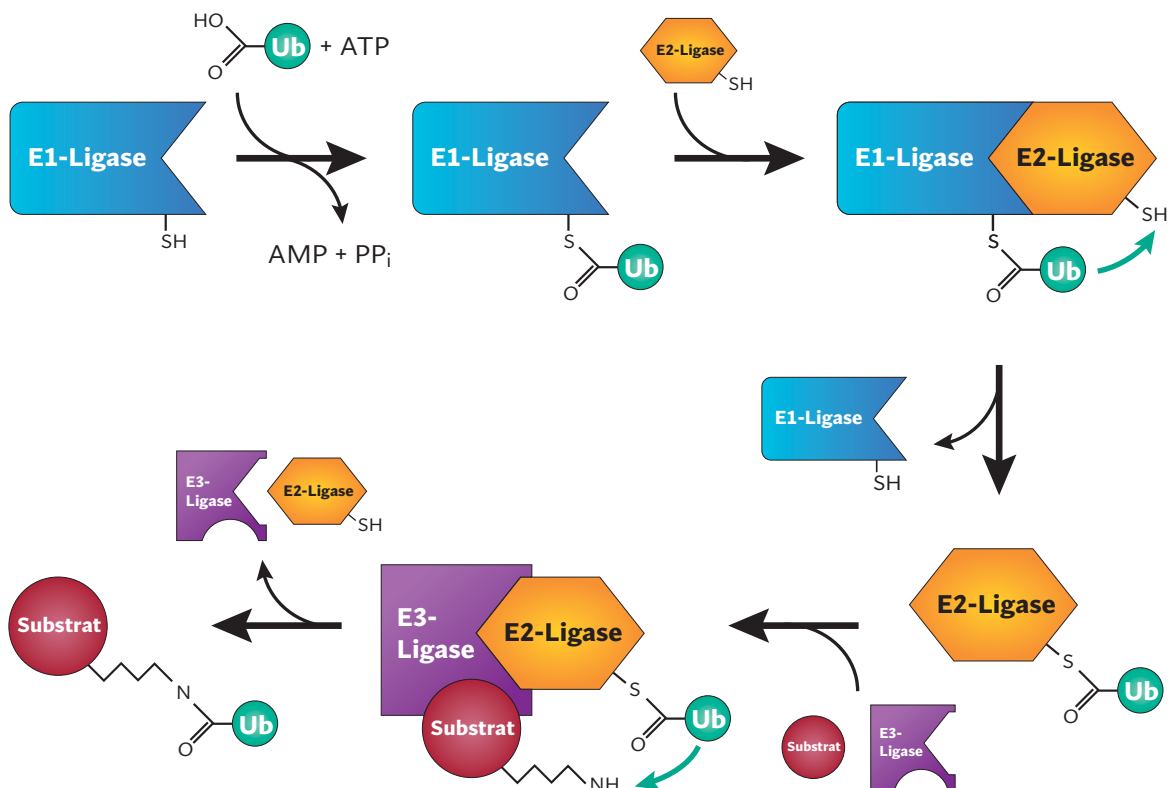


Abbildung 1.14 | Mechanismus der Ubiquitinierung von Substratproteinen

Ubiquitin (Ub) wird in einem dreistufigen Prozess auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests des Substratproteins übertragen.

wichtige Rolle in der Regulierung der Ubiquitinierungskaskade. Zuletzt katalysiert eine Ubiquitin-E3-Ligase die Übertragung des Ubiquitinmoleküls auf das Zielprotein. Da jede E3-Ligase spezifisch die Ubiquitinierung weniger Substratproteine vermittelt, gibt es im menschlichen Genom die beeindruckende Anzahl von 500 – 1000 unterschiedlichen Ubiquitin-E3-Ligasen (Nakayama und Nakayama, 2006), die anhand struktureller Eigenschaften in vier Familien eingeteilt werden (HECT-, RING-*finger*-, U-*box*- oder PHD-*finger*-Typ). Während HECT-E3-Ligasen das Ubiquitin-Molekül zunächst selbst von den E2-Ligasen übernehmen und erst anschließend an das Substratprotein weitergeben, katalysieren die deutlich häufiger vorkommenden E3-Ligasen mit einer RING-Domäne (kurz für *really interesting new gene*) den direkten Transfer des Ubiquitins von der E2-Ligase auf den ϵ -Aminorest des Lysins eines Zielproteins (Pickart und Eddins, 2004).

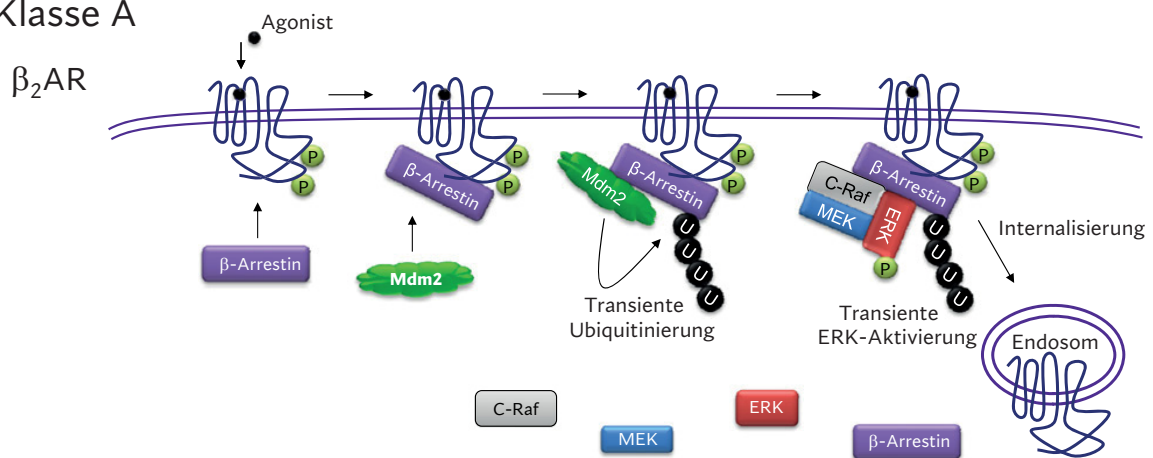
Je nach Aufbau und Struktur der Ubiquitin-Ketten haben die Modifizierungen unterschiedliche Auswirkungen auf das Zielprotein. Am häufigsten sind Polyubiquitin-Ketten über die Lysine 48 und 63 des einen Ubiquitin-Moleküls mit dem nächsten Ubiquitin verknüpft. Ubiquitine, die über K48 aneinandergehängt wurden, werden meist als Erkennungssignal für Proteasomen beschrieben und dienen damit als Signal, das markierte Protein abzubauen (Pickart und Fushman, 2004). K63-verknüpfte Ubiquitin-Ketten spielen hingegen eine wichtige Rolle in vielen anderen Prozessen wie der Internalisierung von Proteinen, Entzündungsreaktionen, der Proteintranslation oder der DNA-Reparatur (Pickart und Fushman, 2004). Auch die Markierung von Proteinen mit einem einzelnen Ubiquitinmolekül (Monoubiquitinierung) führt in der Regel nicht zum Abbau des Proteins, sondern kommt häufig bei Proteinen vor, die internalisiert werden sollen oder an den Endocytosevorgängen beteiligt sind (Staub und Rotin, 2006).

Die Ubiquitinierung von Substratproteinen ist ein dynamischer, reversibler Prozess, denn Ubiquitinreste können durch Deubiquitinasen wieder abgespaltet werden. Diese Enzyme können daher nicht nur die posttranslationale Modifikation von Proteinen wieder ganz entfernen, sondern auch Polyubiquitinketten kürzen bzw. deren Aufbau ändern. Dadurch haben sie ebenfalls Einfluss auf das Verhalten der ubiquitinierten Proteine. Da Ubiquitin selbst nicht als einzelnes Protein translatiert wird, sondern beispielsweise als Polyubiquitinkette oder fusioniert an ribosomale Proteine entsteht, sind die Deubiquitinasen auch für die Generierung von freiem, aktivierten Ubiquitin verantwortlich (Reyes-Turcu *et al.*, 2009).

Dass Arrestin-3 posttranslational mit Ubiquitin modifiziert werden kann, ist bereits seit längerem bekannt (Shenoy *et al.*, 2001). Nach der Aktivierung des β_2 AR wird Arrestin durch die RING-*finger*-Ubiquitinligase Mdm2 (*Murine double minute 2*) ubiquitiniert, was die Interaktion des Proteins mit Clathrin ermöglicht und somit eine Voraussetzung dafür ist, dass der Rezeptor anschließend internalisiert wird (Shenoy *et al.*, 2001). Andere E3-Ligasen wie Nedd4, AIP4 oder Parkin können ebenfalls an Arrestin-3 binden, doch im Gegensatz zu Mdm2 findet bei dieser Interaktion keine Ubiquitinierung des Arrestins statt (Kommaddi und Shenoy, 2013).

Die Ubiquitinierung von Arrestin, die durch die Stimulation von GPCRs induziert wird, ist nach der Aktivierung von Klasse-A-Rezeptoren wie dem β_2 AR nur transient und wird innerhalb von wenigen Minuten wieder entfernt. Bei Klasse-B-Rezeptoren wie dem AT_1R kommt es dagegen zu einer langanhaltenden Ubiquitinierung von Arrestin, die auch nach einer Stunde noch anhält (Shenoy *et al.*, 2003) (vgl. Abb. 1.15). Dass das unterschiedliche Ubiquitinierungsmuster des Arrestins entscheidend dafür sein könnte, ob Arrestin gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert oder nicht bzw. ob es sich um einen Klasse-A- oder Klasse-B-Rezeptor handelt, wurde mithilfe eines stabilen Arrestin-Ubiquitin-Fusionsproteins erforscht. Dieses Fusionsprotein, bei dem das Ubiquitin an den C-Terminus von Arrestin

Klasse A



Klasse B

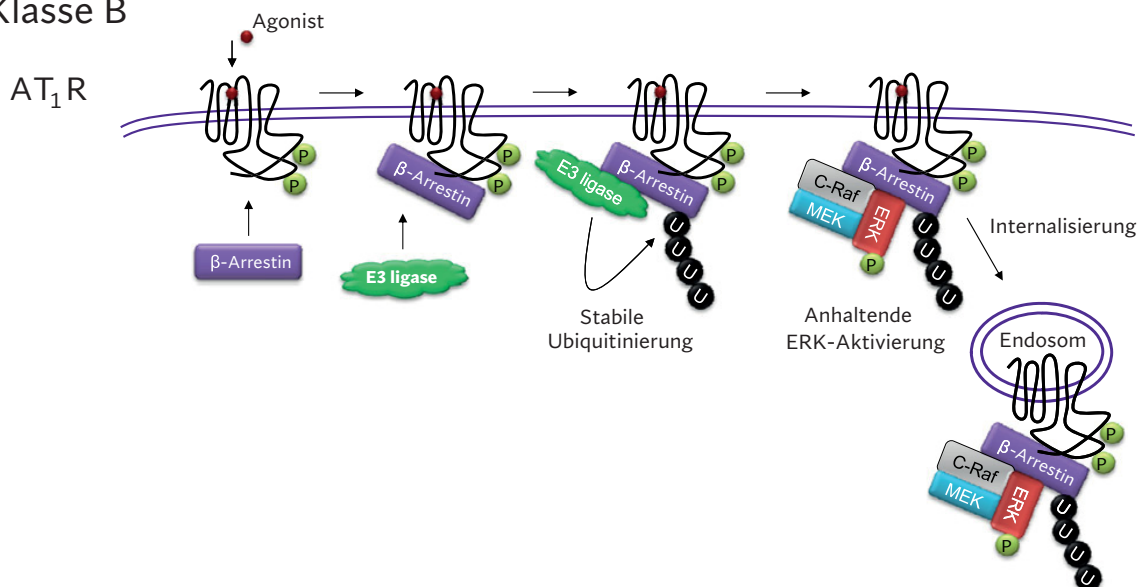


Abbildung 1.15 | Differentielle Ubiquitinierung von β -Arrestin-2 nach der Stimulation von Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren

Nach der Stimulation eines Klasse-A-Rezeptors kommt es durch Mdm2 zu einer transienten Ubiquitinierung von Arrestin-3. Da die Ubiquitinreste schnell wieder entfernt werden und Arrestin-3 infolgedessen nicht mit dem Rezeptor in Endosomen internalisiert wird, ist auch die ERK-Aktivierung durch Arrestin nur transient. Klasse-B-Rezeptoren hingegen führen zu einer stabilen Ubiquitinierung von Arrestin-3, das daraufhin mit dem GPCR in Endosomen transportiert wird und für eine anhaltende ERK-Aktivierung sorgt. (Abbildung verändert nach Kommaddi und Shenoy, 2013.)

tin-3 angehängt wurde, war in der Lage, mit dem Klasse-A-Rezeptor β_2 AR in Endosomen aufgenommen zu werden (Shenoy *et al.*, 2007). Umgekehrt konnte eine Arrestin-Mutante, bei der alle Lysinreste, also alle Ubiquitinierungsstellen, entfernt wurden, auch mit Klasse-B-Rezeptoren nur noch transient interagieren und wurde nicht mehr internalisiert (Shenoy *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Klasse-A-Rezeptoren nur eine kurz andauernde Ubiquitinierung von Arrestin hervorrufen und dieses anschließend vom Rezeptor abdiffundiert. Klasse-B-Rezeptoren führen dagegen zu einer starken und beständigen Ubiquitinierung des Arrestins, das in der Folge zusammen mit dem GPCR internalisiert wird.

Die unterschiedlichen Ubiquitinierungsmuster von Arrestin nach der Stimulation von Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren wurden auf eine wichtige regulatorische Rolle von deubiquitinierenden Enzymen zurückgeführt. Shenoy *et al.* (2009) konnten nachweisen, dass die Aktivierung von Arrestin durch den β_2 AR die Bindung der Deubiquitinase USP33 an Arrestin verstärkt und so die Deubiquitinierung des Arrestins beschleunigt. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation des V_2 R zur Abdissoziation von USP33 vom aktivierten Arrestin, welches folglich auch weniger schnell deubiquitiniert wurde.

Die genauere Untersuchung der möglichen Ubiquitinierungsstellen von Arrestin-3 ergab, dass die Mutation der beiden benachbarten Lysine 11 und 12 zu Argininen dazu führte, dass diese Arrestin-Doppelmutante nicht mehr zusammen mit dem AT_1 R internalisierte. Zudem wies sie nach der Aktivierung des AT_1 R nur noch eine transiente Ubiquitinierung auf. Mit zwei weiteren Klasse-B-Rezeptoren, dem V_2 R und dem NK1R (Neurokinin-1-Rezeptor), wurde die Arrestin-Mutante jedoch weiterhin in Endosomen transportiert und stabil ubiquitiniert (Shenoy *et al.*, 2005). Außerdem führt die dauerhafte Ubiquitinierung von Arrestin zu einer stabileren Bindung an MAP-Kinasen und damit zu einer stärkeren Aktivierung dieser Signalwege durch Klasse-B-Rezeptoren als durch Klasse-A-Rezeptoren (Shenoy *et al.*, 2007).

Nicht nur Arrestine können nach der Stimulation von GPCRs ubiquitiniert werden, sondern auch die Rezeptoren selbst. Die Ubiquitinierung der GPCRs, die bereits kurz nach ihrer Aktivierung detektiert werden kann, ist über mehrere Stunden stabil und nimmt erst mit dem Abbau dieser Rezeptoren wieder ab, der deutlich später stattfindet. Wenn die Ubiquitinierung eines Rezeptors durch das Entfernen relevanter Lysine verhindert wird, ist die Internalisierung des GPCRs nicht beeinträchtigt, sein Transport und Abbau in Lysosomen ist jedoch gestört. Daher dient die Ubiquitinierung von Rezeptoren vermutlich in erster Linie als Signal für ihren Abbau (Shenoy *et al.*, 2008, Jean-Charles *et al.*, 2016).

Arrestin-3 fungiert auch für die an der Ubiquitinierung von GPCRs beteiligten Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen als Adapterprotein. Identifiziert wurde beispielsweise die HECT-E3-Ligase Nedd4, die den β_2 AR ubiquitiniert und damit den Rezeptor für den Abbau des Proteins markiert (Shenoy *et al.*, 2008). Von anderen Rezeptoren ist ebenfalls bekannt,

dass die Anwesenheit von β -Arrestin-2 für ihre Ubiquitinierung nötig ist. Die jeweils beteiligten spezifischen E3-Ligasen sind jedoch bisher unbekannt (Kommaddi und Shenoy, 2013).

1.2.4.2 | SUMOylierung

SUMO-Proteine (*small ubiquitin-related modifier*) sind den Ubiquitinen sehr ähnlich und können ebenfalls als posttranslationale Modifikation an Lysine anderer Proteine angeheftet werden. Im Gegensatz zur Ubiquitinierung dient die SUMOylierung jedoch nicht als Signal zum Proteinabbau, sondern ist an verschiedenen zellulären Prozessen wie dem Kerntransport oder -export, der Transkriptionsregulation, Signaltransduktion oder Zellzyklus-Regulation beteiligt (Hay, 2005). Zwar beträgt die Sequenzidentität zwischen SUMO und Ubiquitin nur 18 %, jedoch liegen sie in einer sehr ähnlichen Struktur vor, die allen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen gemeinsam ist. Mit ca. 100 Aminosäuren (10–12 kDa) ist SUMO etwas größer als Ubiquitin und besitzt am N-Terminus eine Verlängerung von ca. 20 Aminosäuren. SUMO-Proteine werden als Vorläuferproteine translatiert, die in einem ersten Schritt von Sentrin-spezifischen Proteasen (SENPs) am C-Terminus gekürzt werden müssen. Dadurch entsteht ein C-terminales Diglycinmotiv, das ähnlich zu Ubiquitinen mit anderen Proteinen verknüpft werden kann. Der Prozess der SUMOylierung ist der Ubiquitinierung ebenfalls sehr ähnlich und beruht auf der sequenziellen Aktivität von E1-, E2- und E3-Ligasen (Hay, 2005) (vgl. Kap. 1.2.4.1, Abb. 1.14). Die einzige SUMO-E1-Ligase besteht aus dem Heterodimer SAE1-SAE2 (SAE = *SUMO-activating enzyme*) und aktiviert SUMO in einem ATP-abhängigen Prozess, bevor es auf die einzige E2-Ligase Ubc9 übertragen wird. Zuletzt verknüpft Ubc9 SUMO mit einem Substratprotein, wobei die SUMO-E2-Ligase im Gegensatz zu Ubiquitin-E2-Ligasen Signalsequenzen auch direkt erkennen kann und daher nicht zwingend auf die Unterstützung von E3-Ligasen angewiesen ist. Die Familie der SUMO-E3-Ligasen erhöht jedoch die Effizienz der Übertragung von SUMO auf Zielproteine, indem es diese mit Ubc9 zusammenbringt (Gareau und Lima, 2010). Die Lysinreste, die kovalent mit SUMO verknüpft werden, sind typischerweise Teil eines Konsensusmotivs aus vier Aminosäuren ($\Psi Kx(D/E)$, wobei Ψ für eine aliphatisch verzweigte und x für eine beliebige Aminosäure steht), das auch von Ubc9 selbst erkannt wird. Die SUMOylierung von Zielsequenzen, die nicht dem Konsensusmotiv entsprechen, findet durch die Vermittlung von E3-Ligasen statt (Flotho und Melchior, 2013). Die DeSUMOylierung, bei der SUMO wieder vom markierten Protein abgespalten wird, erfolgt durch Isopeptidasen wie die bereits erwähnten SENPs (Wilson, 2017).

Im bovinen β -Arrestin-2 (= Arrestin-3), das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, existieren zwei SUMO-Konsensusmotive, die die Lysine 295 (GKLKHED) und 400 (KGLKDED) beinhalten (Wyatt *et al.*, 2010, Shenoy und Lefkowitz, 2011). Von diesen beiden SUMOylierungsstellen wird nach der Aktivierung des β_2 AR hauptsächlich der Lysinrest 400 im C-Terminus des Arrestins modifiziert. Diese SUMOylierungsstelle ist wichtig für die Interaktion mit AP-2, sodass der Austausch der Lysine in den Konsensusmotiven sowie die Unter-

drückung der gesamten SUMOylierung durch siRNA-Knockout der SUMO-E2-Ligase Ubc9 zu einer deutlich eingeschränkten Internalisierung des β_2 AR führte (Wyatt *et al.*, 2010). Im humanen und murinen Arrestin-3 ist K400 nicht Teil einer klassischen Konsensussequenz (GMKDDD) und wird daher nicht modifiziert. Stattdessen dient hier K295 als primäre SUMOylierungsstelle (Xiao *et al.*, 2015). Die SUMOylierung dieses Lysins im humanen Arrestin-3 spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Interleukin-1-aktivierten Signaltransduktion (Xiao *et al.*, 2015). Die Mutation der entsprechenden SUMOylierungsstelle im murinen Arrestin-3 (K296) beeinträchtigt die Co-Internalisierung von Arr3 K296R mit dem V_2 R oder AT_1 R nicht (Nagi *et al.*, 2020), sodass die SUMOylierung im einzigen Konsensusmotiv offenbar nicht am Transport des Arrestins in Endosomen beteiligt ist.

SUMO wurde ebenfalls bereits als Teil eines chimären Proteins an den C-Terminus von Arrestin-3 fusioniert und führt in dieser Form ähnlich wie Ubiquitin zur Internalisierung des Arrestin-Fusionsproteins mit Klasse-A-Rezeptoren (Nagi *et al.*, 2020). Zudem lokalisiert das dauerhaft SUMOylierte Arrestin verstärkt an der Kernmembran, wo es mit RanGAP1, dem GTPase-aktivierenden Protein für das kleine G-Protein Ran, interagiert (Nagi *et al.*, 2020). Zwar wird vermutet, dass Arrestin-3 und RanGAP1 die SUMOylierung des jeweils anderen Proteins beeinflussen können, jedoch sind die funktionellen Konsequenzen ihrer Interaktion bisher nicht bekannt.

Ob GPCRs selbst durch SUMOylierung modifiziert werden und ob dies ihre Funktion beeinflusst, ist (mit Ausnahme des mGluR8 und des M_1 R (Tang *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2019)) noch nicht ausreichend erforscht (Shenoy und Lefkowitz, 2011, Marchese und Trejo, 2013).

1.3 | Zielsetzung

GPCRs können anhand ihrer Interaktion mit Arrestin in zwei Gruppen unterteilt werden: Rezeptoren der Klasse A binden Arrestin nur vorübergehend und werden ohne Arrestin in die Zelle internalisiert, während Arrestin mit Klasse-B-Rezeptoren stabile Komplexe bildet und auch nach der Internalisierung in Endosomen an die Rezeptoren gebunden bleibt. Die Ursache für dieses unterschiedliche Internalisierungsverhalten verschiedener Rezeptoren mit Arrestinen ist noch weitgehend ungeklärt und sollte im Rahmen dieser Promotionsarbeit genauer untersucht werden. Im Vordergrund stand dabei die Untersuchung der posttranslationalen Modifikation von Arrestin durch Ubiquitinierung, also die Konjugation von Ubiquitin an die Aminosäure Lysin.

Zuerst sollten dabei die Lysinreste 11 und 12 in Arrestin-3 untersucht werden, die als essentielle Ubiquitinierungsstellen für die Internalisierung von Arrestin postuliert wurden. Vorangegangene Untersuchungen hatten jedoch darauf hingewiesen, dass die Mutation der Lysine 11 und 12 zu Argininen (KK11RR) die inaktive Konformation des Arrestins durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert und dadurch auch die Affinität zu verschiedenen Rezeptoren erniedrigen können. Daher sollte untersucht werden, ob der inaktive Zustand der KK11RR-Mutante durch zusätzliche Mutationen wieder destabilisiert werden kann. Dafür wurden in Arrestin-3 KK11RR zum einen die Interaktionspartner der Arginine zu Alaninen mutiert (ED389AA) und zum anderen die aktivierende Mutation R170E eingefügt. Anschließend sollte überprüft werden, ob diese Mutanten wieder stabilere Komplexe mit Klasse-B-Rezeptoren bilden und gemeinsam mit den Rezeptoren co-internalisieren.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war, die Co-Internalisierung des Arrestin mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren durch die Elimination von Ubiquitinierungsstellen in Arrestin-3 zu verhindern. Anhand verschiedener Einzel- und Mehrfachmutanten sollten Lysinreste identifiziert werden, die essentiell für die Internalisierung von Arrestin-3 mit GPCRs sind. Außerdem sollte mit Hilfe eines Ubiquitinierungs- und eines SUMOylierungsinhibitors der Einfluss der beiden posttranslationalen Modifikationen auf das Internalisierungsverhalten von Arrestin-3 untersucht werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollte anhand von FRAP-Experimenten mit verschiedenen μ OR-Agonisten untersucht werden, ob Liganden, die sehr lange am Rezeptor gebunden bleiben, besonders stabile Komplexe zwischen Rezeptor und Arrestin induzieren können. Von besonderem Interesse war dabei, ob die Stimulation des μ OR mit spezifischen Agonisten, die nur langsam vom Rezeptor dissoziieren, dazu führt, dass Arrestin ebenfalls sehr lange am Rezeptor binden kann, sodass der μ OR Rezeptor sein Verhalten von Klasse A zu Klasse B verändert, indem Arrestin mit dem μ OR in Endosomen transportiert wird.

Kapitel 2 | Materialien

2.1 | Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (25 mM, rund)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (6 ml)	Neolab, Heidelberg
Eppendorf-Gefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Parafilm	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße	VWR, Darmstadt
PVDF-Membranen	Roche, Mannheim
Petrischalen (Kunststoff, 10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (1 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen (2,5 µl)	Carl Roth, Karlsruhe
Whatman-Filterpapier	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 6-Well-Schalen)	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well-Platten (schwarz, transparenter Boden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 2.1 | Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.2 | Chemikalien

Allgemeines

Aktivkohle	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA) delipidiert	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose	Sigma Aldrich, Steinheim
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl (Immersion 518F)	Zeiss, Jena
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Sigma Aldrich, Steinheim

Kaliumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 2.2 | Verwendete Chemikalien**Zellkultur**

DMEM (High Glucose, 4,5 g/l)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Effectene [®] Transfection Reagent Kit	Qiagen, Hilden
FCS (fetales Kälberserum)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
L-Glutamin (200 mM)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
PBS	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Penicillin/Streptomycin 100x	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Poly-(L)-Lysin-Hydrobromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund

Tabelle 2.3 | Verwendete Reagenzien und Kits für die Zellkultur**Proteinbiochemie/Western Blots**

2-D08 (SUMOylierungsinhibitor)	MedChemExpress, Monmouth Junction, USA; Lieferant: Biozol Diagnostics, Eching
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-FLAG-Agarose	Sigma Aldrich, Steinheim
Bradford-Reagenz	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Cheluminate HRP Pico Detect (ECL-Lösung)	Applichem, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma Aldrich, Steinheim
DL-Dithiothreitol	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol 87 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Igepal	Sigma Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleinimid	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphataseinhibitor Phos-Stop	Roche, Mannheim
Proteaseinhibitor cOmplete Mini Tablets	Roche, Mannheim
TAK-243 (Ubiquitinierungsinhibitor)	MedChemExpress, Monmouth Junction, USA; Lieferant: Hölzel Diagnostika, Köln
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe

Tris-Base	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Sigma Aldrich, Steinheim

Tabelle 2.4 | Verwendete Reagenzien und Kits für proteinbiochemische Methoden**Klonierungen**

1 kb /100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose (LE)	Biochrom, Berlin
Ampicillin-Natrium	Applichem, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma Aldrich, Steinheim
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	New England Biolabs, Frankfurt
Ethidiumbromid (0,025 %-ige Lösung)	Promega, Walldorf
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ladepuffer für Agarosegele (Loading Dye)	New England Biolabs, Frankfurt
LB-Medium nach Lennox	Applichem, Darmstadt
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs, Frankfurt
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs, Frankfurt
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Kit	New England Biolabs, Frankfurt
Q5 DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
RNase A	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

Tabelle 2.5 | Verwendete Reagenzien und Kits für Klonierungen**Agonisten**

Adrenalin	Merck, Darmstadt
Angiotensin II	Sigma Aldrich, Steinheim
Arg-Vasopressin	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
BI-167107	Böhringer Ingelheim, Ingelheim
DAMGO ([D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-Enkephalin-Acetat)	Sigma Aldrich, Steinheim
Etorphin	Wildlife Pharmaceuticals, White River, Südafrika; Lieferant: Chilla CTS, Georgsmariahütte
PTH 1-34	Biozol Diagnostics, Eching
(-)-Isoprenalinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Morphin (Morphinhydrochlorid x 3 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Neurotensin	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

Prostaglandin E ₂	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
SR17018	freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Stefan Schulz, Universitätsklinikum Jena

Tabelle 2.6 | Verwendete Agonisten

Antikörper

Primärantikörper

Aktin (monoklonal, Maus)	0869100-CF	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
GFP (polyklonal, Ziege)	600-101-215	Rockland, Limerick, USA
FLAG (polyklonal, Kaninchen)	F7425	Sigma Aldrich, Steinheim
Ubiquitin (polyklonal, Kaninchen)	3933	Cell Signaling, Danvers, USA

Tabelle 2.7 | Verwendete Primär-Antikörper

Sekundärantikörper

Maus (mit HRP)	7076	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen (mit HRP)	7074	New England Biolabs, Frankfurt

Tabelle 2.8 | Verwendete Sekundärantikörper

2.3 | Geräte

Allgemeine Geräte

Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Attofluor Cell Chamber	Invitrogen, Darmstadt
Autoklav (Vertikaler Standautoklav VX-95)	Systec GmbH, Linden
Chemidoc-XRS	Bio-Rad, München
Digitalwaage	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Eismaschine Ice flaker F100 Compact Incubator	Icematic, Düsseldorf
ENDURO 300 Volt Power Supply	Labnet International, Edison, USA
Feinwaage 700 (precision balance)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
FiveEasy pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific, Dreieich
Hitzesterilisator	Thermo Scientific, Dreieich
Inkubator APT.line C150	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Leica TC-SP5 Konfokalmikroskop	Leica, Wetzlar
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikrowelle	Sharp
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Modul	Bio-Rad, München
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresesystem	Bio-Rad, München

Mini Trans-Blot® System	Bio-Rad, München
Multikanal-Pipette	Gilson, Limburg-Offheim
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
NanoPhotometer NanoDrop	Implen, München
PCR-Maschine (Labcycler Gradient)	SensoQuest, Göttingen
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage Ultra Clear UV plus	SG, Sundern
Schüttler für Bakterienkulturen	GFL, Burgwedel
Schüttler für Western Blots	Stuart Equipment, Stone, UK
Sonifier Branson Cell Disrupter S-450D	Branson Ultrasonics, Dietzenbach
Sterilwerkbank Esco ac2-4e8-tu sentinel gold	Esco Technologies, Inc., Hatboro, USA
Sterilwerkbank LabGard ES NU 437- 400E Klasse II	NuAire, Plymouth, USA
Tecan Spark 20M	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax T10 basic	IKA-Werke, Staufen
Ultrazentrifuge Optima XE-90 (Rotor Ti70.1)	Beckman Coulter, Krefeld
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge (Heraeus Fresco 17)	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16R)	Thermo Scientific, Dreieich

Tabelle 2.9 | Verwendete Laborgeräte

FRET-Mikroskop (Visitron-Setup)

CCD-Kamera: Spot Pursuit	Spot Imaging / Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
Filterblock im Optosplit: Dichroischer Strahlenteiler: 505LP Emissionsfilter CFP: 470/24 Emissionsfilter YFP: 525/39	Chroma, Bellows Falls, USA Chroma, Bellows Falls, USA Semrock, Rochester, USA
Druckluftgefederter Tisch	Newport Spectra-Physics, Stahnsdorf
Filterblock: Messfilter Anregungsfilter: 436/20 Dichroischer Strahlenteiler: 458LP	Chroma, Bellows Falls, USA Semrock, Rochester, USA
Filterblock: CFP-YFP-Modus Dualband-Anregungsfilter: 416/501 Dichroischer Strahlenteiler: 440/520 Dualband-Emissionsfilter: 464/547	Semrock, Rochester, USA Semrock, Rochester, USA Semrock, Rochester, USA
LED-Lichtquellen: pE-100 (440 nm, 500 nm)	CoolLED, Andover, UK
Mikromanipulator mMJ	Märzhäuser, Wetzlar
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Objektiv PlanApo N 60x/1.45 Oil	Nikon, Tokio, Japan
Perfusionssystem ALA VC3-8xP	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA

Tabelle 2.10 | Mikroskop

2.4 | Software und Datenbanken

ApE - A plasmid Editor	M. Wayne Davis (University of Utah, Salt Lake City, USA)
Adobe Illustrator 2020	Adobe Inc., San José, USA
Adobe InDesign 2020	Adobe Inc., San José, USA
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), blast.ncbi.nlm.nih.gov	National Library of Medicine, Bethesda, USA
GraphPad Prism 8.3	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ (Fiji-Paket)	National Institutes of Health, Bethesda, USA
ImageLab	Bio-Rad, München
LAS AF	Leica, Wetzlar
LAS AF Lite	Leica, Wetzlar
Mendeley Desktop	Mendeley, London, UK
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
OriginPro 2018	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Protein Data Bank (PDB), rcsb.org	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)
Pubmed, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/	National Library of Medicine, Bethesda, USA
PyMOL	DeLano Scientific LLC, Palo Alto, USA
Quantity One	Bio-Rad, München
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
VisiView	Visitron Systems, Puchheim

Tabelle 2.11 | Verwendete Programme und Datenbanken

2.5 | Eukaryotische und prokaryotische Zelllinien

Zur Plasmidamplifikation in Bakterien wurden in dieser Arbeit *E. coli*-Bakterien vom Stamm DH5 α (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Der *E. coli*-Stamm RosettaTM2(DE3) (Novagen, Darmstadt) wurde zur Expression rekombinanter Proteine eingesetzt.

Experimente in eukaryotische Zelllinien wurden mit adhärent wachsenden HEK293T-Zellen oder NIH/3T3-Zellen durchgeführt.

2.6 | Plasmide

Plasmid	Spezies	Referenz
pcDNA3	-	Invitrogen, Darmstadt
Arr3-mTurquoise	Rind	Miess <i>et al.</i> , 2018
Arr3-mTurquoise KK11RR	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise R170E	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise KK11RR R170E	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise ED389AA	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise KK11RR ED389AA	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise noK	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K108R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K293R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K295R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K308R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K108R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R K108R K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R K108R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K108R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R K108R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R K108R K153R K178R K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-mTurquoise K50R K108R K153R K178R K293R K295R K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP KK11RR	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP KK11RR R170E	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP R170E	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP ED389AA	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP KK11RR ED389AA	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP noK	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K108R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K293R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K295R	Rind	diese Arbeit

Plasmid	Spezies	Referenz
Arr3-GFP K308R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K108R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R K108R K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R K108R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K108R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R K108R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R K108R K153R K178R K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-GFP K50R K108R K153R K178R K293R K295R K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG	Rind	Zindel, 2015
Arr3-FLAG KK11RR	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG R170E	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG KK11RR R170E	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG ED389AA	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG KK11RR ED389AA	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K108R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K293R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K295R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K308R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K108R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R K108R K153R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R K108R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K108R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R K108R K153R K178R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R K108R K153R K178R K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-FLAG K50R K108R K153R K178R K293R K295R K308R K400R	Rind	diese Arbeit
Arr3-nLuc	Rind	Al-Zamel <i>et al.</i> , 2019
FLAG-Arr3	Rind	diese Arbeit
FLAG-Arr3-Ubiquitin	Rind	diese Arbeit
pTrcArr3-FLAG	Rind	diese Arbeit

Plasmid	Spezies	Referenz
FLAG- β_2 AR-YFP	Mensch	Krasel <i>et al.</i> , 2005
FLAG- β_2 AR-mCherry	Mensch	diese Arbeit
YFP- β_2 AR	Mensch	Dorsch <i>et al.</i> , 2009
FLAG- β_2 AR-SSS-YFP	Mensch	Zindel <i>et al.</i> , 2015
FLAG- β_2 AR-SSS-mCherry	Mensch	diese Arbeit
YFP- β_2 AR-SSS	Mensch	Zindel <i>et al.</i> , 2015
FLAG- β_2 V ₂ R-YFP	Mensch	Oakley <i>et al.</i> , 1999
FLAG- β_2 V ₂ R-mCherry	Mensch	diese Arbeit
YFP- β_2 V ₂ R	Mensch	Zindel <i>et al.</i> , 2015
HA-PTHR	Mensch	Zindel <i>et al.</i> , 2016
HA-PTHR-YFP	Mensch	Zindel <i>et al.</i> , 2016
HA-PTHR-mCherry	Mensch	diese Arbeit
μ OR-SYFP2	Ratte	Miess <i>et al.</i> , 2018
μ OR-mCherry	Ratte	diese Arbeit
YFP- μ OR	Ratte	diese Arbeit
AT ₁ R	Ratte	freundlicherweise bereitgestellt von Thomas Walter (Cork, Irland)
V ₂ R	Mensch	freundlicherweise bereitgestellt von Martin Lohse
NTSR1-mCherry	Mensch	diese Arbeit
EP4	Mensch	cDNA Resource Center, Bloomsburg University (www.cdna.org), #PER0400000
GRK2	Mensch	Krasel <i>et al.</i> , 2001
mCherry-EEA1	Mensch	Zindel <i>et al.</i> , 2015
Ubiquitin-YFP	Ratte	Zindel, 2015
mCherry-Mdm2	Mensch	diese Arbeit
p53-GFP	Mensch	Boyd <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 2.12 | Verwendete Plasmide

2.7 | PCR-Primer

Name	Template	Sequenz	Klonierung
Arr3-FLAG-Stopp-XbaI	Arr3-mTurquoise	AAAAAATCTAGATCACTTGTCAT CATCGTCCTTGTA TCGCAGAAC TGGTCGTCATAGTC	C-terminale Markierung von Arr3 mit FLAG-Sequenz
Arr3 K50R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	CCCGGACTACTTGAGGGACCGC AAAGTGT	Punktmutation K50R
Arr3 K108R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	GCGGCTGCTGAGGAGGCTGGGC CAGCATG	Punktmutation 108R
Arr3 K153R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	GAGCCTTCTGCGCCAGATCACTA GAAGAGAA	Punktmutation 153R
Arr3 K178R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	TTTGCCCCAGAGAGACCCGGCC CCCA	Punktmutation K178R

Name	Template	Sequenz	Klonierung
Arr3 K293R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	CGCTCTGGATGGGAGGCTCAAG CACGAGG	Punktmutation K293R
Arr3 K295R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	GGATGGGAAGCTCAGGCACGAG GACACCA	Punktmutation K295R
Arr3 K308R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	CAGCACCATTGTGAGGGAGGGT GCCAACA	Punktmutation K308R
Arr3 K400R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	GCTCAAGGGGCTGAGGGACGAG GACTATGA	Punktmutation K400R
Arr3 K293R K295R	Arr3 (unabhängig von Markierung)	CTCTGGATGGGAGGCTCAGGCAC GAGGACAC	Punktmutationen K293R und K295R
Arr3 R50K rück	Arr3 mit K50R-Punkt- mutation (unabhängig von Markierung)	CCCGGACTACTTGAAGGACCGCA AAGTGT	Entfernung der Punkt- mutation K50R
Arr3 R108K rück	Arr3 mit K108R-Punkt- mutation (unabh. von Markierung)	GCGGCTGCTGAGGAAGCTGGGCC AGCATG	Entfernung der Punkt- mutation K108R
Arr3 R178K rück	Arr3 mit K178R-Punkt- mutation (unabh. von Markierung)	CCCGGACTACTTGAAGGACCGCA AAGTGT	Entfernung der Punkt- mutation K178R
Hind-Start- FLAG-Arr3	mTurquoise-Arr3	AAAAAAAAGCTTATGGACTACAA GGACGATGATGACAAGGGGGAGA AACCCGGGAC	N-terminale Markie- rung von Arr3 mit FLAG-Sequenz
Arr3-FLAG- Frag-for	Arr3-FLAG	CGATTAAATAAGGAGGAATAAAC CATGGGGGAGAAACCCGGG	Klonierung von pTrcArr3-FLAG mit Gibson-Assembly
Arr3-FLAG- Frag-rev	Arr3-FLAG	CCAAGCTTCTACTTGTTCATCATCG TCCTTGTAAGTCGCAGAAC	
TrcArr2- Vekt-for	pTrcArr2	ATGATGACAAGTAGAAGCTTGGC TGTTTTGGCGGATGAGA	
TrcArr2- Vekt-rev	pTrcArr2	CATGGTTTATTCCTCCTTATTTAA TCGATACATTAATATATACCTCTTT	
BamHI- Start- NTSR1-fw	NTSR1-Tango	AAAAAAGGATCCATGAGACTGAA CTCTTCCGCTCC	Änderung der C-termi- nalen Fluoreszenzmar- kierung des NTSR1
Xba-NTSR1- rev	NTSR1-Tango	AAAAAATCTAGAGTACAGCGTTT CCCAGTGGC	C-term. Fluoreszenz- markierung des NTSR1
Xba-Stop- NTSR1-rev	NTSR1-Tango	AAAAAATCTAGATTAGTACAGCG TTTCCCGAGTGGC	Entfernung der C-term. Tango-Mar- kierung
mCherry- Frag-fw	PTHR-mCherry	GACCCGGATCCATGGTGAGCAAG GGCGAGGAG	Klonierung von mCherry-mdm2 mit Gibson-Assembly
mCherry- Frag-rev	PTHR-mCherry	CCATGAATTCCTTGTACAGCTCGT CCATGCCG	
mdm2-Vek- tor-rev	mTurquoise-mdmd2	ACCATGGATCCGGGTCTCCCTATA GTGAGTCGTATTAATTTT	
mdm2-Vek- tor-fw	mTurquoise-mdmd2	AGCTGTACAAGGAATTCATGG	
Hind-Start- p53-fw	p53-GFP	AAAAAAAAGCTTATGGAGGAGC CGCAGTCAGATCC	Änderung der C-term. Markierung von p53
p53-Xba-rev	p53-GFP	AAAAAATCTAGAGTCTGAGTCAG GCCCTT	Änderung der C-term. Markierung von p53

Tabelle 2.13 | Verwendete PCR-Primer

2.8 | Puffer & Lösungen

2.8.1 | Zellkultur

DMEM-Vollmedium

1 Flasche (= 450 ml)	DMEM High Glucose (4,5 g/l)
50 ml	FCS
5,5 ml	L-Glutamin
5,5 ml	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin)

Tabelle 2.14 | DMEM-Supplementation

2.8.2 | Klonierungen

LB-Medium (flüssig)

Zur Herstellung von flüssigem LB-Nährmedium für Bakterien wurden 100 g LB-Medium nach Lennox (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) in 5 L Reinstwasser gelöst, je 500 ml in eine Flasche abgefüllt und direkt autoklaviert.

100 g	LB-Medium nach Lennox
ad 5 l	H ₂ O

Tabelle 2.15 | Rezeptur für LB-Medium

LB-Agar (fest)

Zur Herstellung von Agarplatten wurden zu 250 ml des zuvor genannte LB-Flüssigmedium 3,75 g Agar (Endkonzentration: 1,5 %) hinzugefügt, in eine Flasche abgefüllt, ein Rührfisch hinzugefügt und direkt im Anschluss an die Herstellung autoklaviert.

250 ml	LB-Medium (flüssig)
3,75 g	Agar

Tabelle 2.16 | Rezeptur für LB-Agar

TSB-Puffer

Alle Bestandteile wurden in LB-Medium gelöst und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt.

Konzentration	Reagenz
10 %	PEG3000
5 %	DMSO
20 mM	MgCl ₂ oder MgSO ₄

Tabelle 2.17 | Rezeptur für TSB-Puffer

KCM-Puffer

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* wurde KCM-Puffer hergestellt, sterilisiert und bei 4 °C gelagert.

Masse	Reagenz	Endkonzentration
3,73 g	KCl	500 mM
1,66 g	CaCl ₂	150 mM
2,38 g	MgCl ₂	250 mM
ad 100 ml	H ₂ O	-

Tabelle 2.18 | Rezeptur für KCM-Puffer

Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml

Die Ampicillin-Lösung wurde nach der Herstellung zu 1,5 ml in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Verwendung als Selektionsantibiotikum in LB-Flüssigmedium oder LB-Agar wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt (Verdünnung 1:1000).

2 g	Ampicillin
ad 20 ml	H ₂ O

Tabelle 2.19 | Rezeptur für Ampicillin-Stammlösung

Kanamycin-Stammlösung 50 mg/ml

Die Kanamycin-Stammlösung wurde nach der Herstellung zu 1,5 ml in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Verwendung als Selektionsantibiotikum in LB-Flüssigmedium oder LB-Agar wurde Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml eingesetzt.

500 mg	Kanamycinsulfat
ad 10 ml	H ₂ O

Tabelle 2.20 | Rezeptur für Kanamycin-Stammlösung

TAE-Puffer 50x

Zur Durchführung von Agarose-Gelelektrophoresen wurde TAE-Puffer benötigt, um die Leitfähigkeit sicherzustellen. Die 50 x Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:50 verdünnt.

242 g	Tris-Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1000 ml	H ₂ O

Tabelle 2.21 | Rezeptur für TAE-Puffer 50x

Agarose-Gele wurden in der Regel mit 1 % Agarose in TAE-Puffer angesetzt und zusätzlich mit einem Tropfen Ethidiumbromid gemischt.

Lösungen für Mini-Präparationen**Resuspensionspuffer Lösung 1**

Alle Bestandteile wurden in Reinstwasser gelöst, der pH-Wert auf 8,0 eingestellt und die Lösung anschließend sterilisiert.

50 mM	Glucose
10 mM	EDTA
25 mM	Tris-Base
ad 1000 ml	H ₂ O

Tabelle 2.22 | Rezeptur für Lösung 1

Lysepuffer Lösung 2

Alle Bestandteile wurden in Reinstwasser gelöst.

0,2 M	NaOH
1 %	SDS

Tabelle 2.23 | Rezeptur für Lösung 2

Neutralisationspuffer Lösung 3

29,44 g	Kaliumacetat
11,5 ml	Essigsäure (96 %)
ad 100 ml	H ₂ O

Tabelle 2.24 | Rezeptur für Lösung 3

2.8.3 | Mikroskopie

FRET-Puffer

Dieser Puffer sollte ein physiologisches extrazelluläres Milieu nachahmen und wurde für Mikroskopie-Experimente mit eukaryotischen Zellen verwendet. Nach Herstellung wurde der Puffer mit NaOH-Lösung auf pH 7,3 eingestellt und partikelfrei filtriert.

Masse/Volumen	Stammlösung	Reagenz	Endkonzentration
27,4 ml	5 M	NaCl	137 mM
5,4 ml	1 M	KCl	5,4 mM
2 ml	1 M	CaCl ₂	2 mM
1 ml	1 M	MgCl ₂	1 mM
2,38 g	-	HEPES	10 mM
ad 1000 ml	-	H ₂ O	-

Tabelle 2.25 | Rezeptur für FRET-Puffer

2.8.4 | Western Blots

1,5 M Tris-Lösung (pH 8,8)

Nach Herstellung wurde der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 8,8 eingestellt.

23,6 g	Tris-HCl
ad 100 ml	H ₂ O

Tabelle 2.26 | Rezeptur für 1,5 M Tris-Lösung

0,5 M Tris-Lösung (pH 6,8)

Nach Herstellung wurde die Lösung mit NaOH-Lösung auf pH 6,8 eingestellt.

7,88	Tris-HCl
ad 100 ml	H ₂ O

Tabelle 2.27 | Rezeptur für 0,5 M Tris-Lösung

Trenngel 12 % (7,5 ml)

Das fertig gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um Blasen an der Oberkante des Trenngels sowie den Kontakt zum Luftsauerstoff, der als Radikalfänger fungieren kann, zu verhindern. Nach ca. 30 min konnte das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen werden.

2,5 ml	H ₂ O
1,9 ml	1,5 M Tris-Lösung
3,0 ml	Acrylamid 30 %
75 µl	SDS 10 %
75 µl	APS 10 %
3 µl	TEMED

Tabelle 2.28 | Rezeptur für 12%-iges Trenngel**Sammelgel (3,0 ml)**

Um die Sichtbarkeit der Taschen im fertigen Gel zu verbessern, konnten zusätzlich einige Körnchen Phenolrot-Pulver hinzugefügt werden. In das noch flüssige Trenngel wurde vorsichtig ein Kamm gesteckt, um Taschen zum Beladen des Polyacrylamidgels zu erhalten. Ein erneutes Überschichten mit Isopropanol ist dadurch nicht nötig.

2,1 ml	H ₂ O
0,38 ml	0,5 M Tris-Lösung
0,5 ml	Acrylamid 30 %
30 µl	SDS 10 %
30 µl	APS 10 %
3 µl	TEMED

Tabelle 2.29 | Rezeptur für Sammelgel

Lysepuffer

Nach Herstellung wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Direkt vor der Verwendung wurden pro 10 ml des Puffers zusätzlich je eine Tablette PhosStop (Phosphatase-Inhibitor) und cOmplete mini (Protease-Inhibitor) sowie bei der Untersuchung der Ubiquitinierung 10 mM N-Ethylmaleinimid (0,0125 g) als Deubiquitinase-Inhibitor hinzugefügt.

Konzentration	Masse/Volumen	Reagenz
50 mM	0,595 g	HEPES
0,5 %	0,25 ml	Igepal
250 mM	0,730 g	NaCl
2 mM	0,029 g	EDTA
10 %	5 ml	Glycerol
-	ad 50 ml	H ₂ O

Tabelle 2.30 | Rezeptur für Lysepuffer**SDS-Probenpuffer (5x)**

5 ml	Glycerol
2 ml	1,5 M Tris-Lösung, pH 6,8
1 g	SDS
2,5 ml	β-Mercaptoethanol
0,5 ml	1 % Bromphenolblau
ad 10,0 ml	H ₂ O

Tabelle 2.31 | Rezeptur für SDS-Probenpuffer**Laufpuffer (10x)**

Die 10 x Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

144 g	Glycin
30 g	Tris-Base
10 g	SDS
ad 1000 ml	H ₂ O

Tabelle 2.32 | Rezeptur für Laufpuffer 10x

Transferpuffer (10x)

Nach Herstellung wurde der pH-Wert des Puffers auf 8,3 eingestellt.

144 g	Glycin
30 g	Tris-Base
ad 1000 ml	H ₂ O

Tabelle 2.33 | Rezeptur für Transferpuffer 10x

Vor Gebrauch wurden 100 ml der Stammlösung mit 200 ml 96 %-igem Ethanol und 700 ml vermischt.

TBS (10x)

Nach Herstellung wurde der pH-Wert des Puffers mit HCl auf 7,5 eingestellt.

292 g	NaCl
24,4 g	Tris-Base
ad 1000 ml	H ₂ O

Tabelle 2.34 | Rezeptur für TBS 10x

TBST

100 ml	TBS (10x)
900 ml	H ₂ O
500 µl	Tween® 20

Tabelle 2.35 | Rezeptur für TBST

Stripping-Puffer

Nach Herstellung wurde der pH-Wert des Puffers mit HCl auf 2,2 eingestellt.

1,5 g	Glycin
0,1 g	SDS
1 ml	Tween® 20
ad 100 ml	H ₂ O

Tabelle 2.36 | Rezeptur für Stripping-Puffer

2.8.5 | Weitere verwendete Puffer

Puffer für Trypsin-Verdau („Trypsin digestion buffer“)

Nach Herstellung wurde der pH-Wert des Puffers auf 8,0 eingestellt.

Konzentration	Masse/Volumen	Reagenz
20 mM	0,158 g	Tris-HCl
2 mM	0,015 g	CaCl ₂
-	ad 50 ml	H ₂ O

Tabelle 2.37 | Rezeptur für Puffer für Trypsin-Verdau

Rosetta-Lysepuffer

Nach Herstellung wurde der pH-Wert des Puffers auf 8,5 eingestellt. Direkt vor Gebrauch wurden außerdem 10 mM DTT sowie für je 10 ml des Puffers eine Tablette cOmplete Mini Protease-Inhibitor hinzugefügt.

Konzentration	Masse/Volumen	Reagenz
20 mM	0,121 g	Tris-HCl
50 mM	0,146 g	NaCl
5 %	2,5 ml	Glycerol
-	ad 50 ml	H ₂ O

Tabelle 2.38 | Rezeptur für Rosetta-Lysepuffer

Kapitel 3 | Methoden

3.1 | Zellkultur

Alle in Kap. 3.1 beschriebenen Arbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Laminar-Airflow-Werkbank durchgeführt.

3.1.1 | Kultivierung von HEK293T-Zellen

Die Kultivierung von HEK293T-Zellen erfolgte in 10 cm-Zellkulturschalen in DMEM-Nährmedium (4,5 g/l Glucose, supplementiert mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (siehe Kap. 2.8.1)) bei 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre, die mit 5% CO₂ angereichert war. Sie wurden in der Regel zweimal pro Woche zum Ausdünnen auf neue Zellkulturschalen passagiert. Hierfür wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen zum Ablösen für wenige Minuten mit 1 ml Trypsin-/EDTA-Lösung (0,05 %) inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml frischem Medium wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt und alle Zellen von der Schale heruntergespült. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für drei Minuten bei 1000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vom Zellpellet abgenommen und die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die gewünschte Menge an Zellsuspension wurde schließlich auf eine neue Zellkulturschale mit genügend frischem Nährmedium überführt. Für Experimente wurden HEK293T-Zellen zusätzlich in der gewünschten Dichte auf 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät.

3.1.2 | Kultivierung von NIH/3T3-Zellen

NIH/3T3-Zellen wurden ähnlich zu den HEK293T-Zellen (siehe Kap. 3.1.1) kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Allerdings wurde zum Ablösen der Zellen noch ein zusätzlicher Spülschritt mit PBS sowie eine mehrminütige Inkubation mit Trypsin-/EDTA-Lösung bei 37 °C benötigt. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu Kap. 3.1.1.

3.1.3 | Transiente Transfektion von Zellen mit Effectene®

Zur transienten Transfektion der HEK293T- und NIH/3T3-Zellen wurde das Effectene® Transfection Reagent Kit (QIAGEN) verwendet. Hierfür wurden die Zellen so auf 6 cm-Zellkulturschalen gesplittet, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 50–75 % konfluent waren. Die gewünschte Plasmidmischung wurde in ein Eppendorfgefäß vorgelegt, mit 150 µl EC-Puffer und 16 µl Enhancer vermischt und für drei Minuten inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Effectene zugegeben, der gesamte Ansatz gemischt und für weitere sieben Minuten inkubiert. Zuletzt wurde etwas überstehendes Nährmedium der zu transfizierenden Zellen untergemischt und die Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft. 20–24 Stunden später wurde die Transfektion gestoppt, indem die Zellen von der 6 cm-Schale abgenommen wurden. Zellen, die für Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden sollten, wurden in der gewünschten Dichte auf PLL-beschichtete Deckgläschen überführt. Zellen, die für Versuche mit dem Plattenlesegerät benötigt wurden, wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die benötigte Zellzahl auf 96-Well-Platten ausgebracht. Die Messung der genannten Zellen erfolgte ca. 40 h nach der Transfektion. Für Western-Blot-basierte Methoden wurden die transfizierten Zellen ca. 24 h nach der Transfektion wie in Kap. 3.4.2 beschrieben geerntet und sofort weiterverwendet.

3.1.4 | Beschichten von Deckgläschen und 96-Well-Platten mit PLL

Um die Zelladhäsion an den Deckgläschen aus Glas zu verbessern, wurden diese mit dem kationischen Polymer Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Hierzu wurden die Deckgläschen zunächst einzeln zur Sterilisation in 70 %-igen Ethanol getaucht und anschließend in PBS-gefüllte 6-Well-Platten überführt, um die Ethanolreste abzuwaschen. Nach dem vollständigen Absaugen der Flüssigkeit wurden etwa 150 µl PLL-Lösung mittig auf jedem Deckgläschen platziert und für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde das PLL wieder abgesaugt und die Deckgläschen gründlich mit PBS gewaschen, um für die Zellen toxische PLL-Reste zu entfernen.

Zur Beschichtung von 96-Well-Platten wurden 100 µl PLL in jedes Reservoir gegeben und für mindestens 30 min inkubiert, ehe die Flüssigkeit wieder vollständig abgenommen und jedes Well zweimal mit 200 µl PBS gewaschen wurde. Anschließend wurde die 96-Well-Platte zur Sterilisation für 20 min mit UV-Licht bestrahlt.

3.2 | Molekularbiologische Methoden

3.2.1 | DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, kurz PCR) ist ein enzymabhängiges Verfahren, mit dem DNA bzw. ein bestimmter DNA-Abschnitt *in vitro* vervielfältigt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Methode außerdem verwendet, um gezielt Mutationen in die untersuchten Proteine einzuführen (siehe Kap. 3.2.2) oder um die flankierenden Bereiche benötigter DNA-Sequenzen so zu verändern, dass sie mittels Subklonierung (siehe Kap. 3.2.3) oder Gibson-Assembly (siehe Kap. 3.2.8) neu zusammengefügt werden konnten.

Hierzu wurde ein DNA-*Template* benötigt, das die Sequenz enthielt, die amplifiziert, mutiert oder deren Enden verändert werden sollte. Je nach PCR wurden ein oder zwei passende *Primer* (DNA-Oligonukleotide) erstellt, die die zu verändernden Bereiche enthielten und gleichzeitig genügend komplementäre Basen zum Vorwärts- oder Rückwärtsstrang des *Templates* aufwiesen, um sich an die DNA anlagern zu können. Sollte ein Teilabschnitt eines Plasmids amplifiziert werden, wurden sie so entworfen, dass sie den entsprechenden DNA-Abschnitt eingrenzten und bei Bedarf Änderungen in der flankierenden Sequenz enthielten. Hierfür wurden die kostenlosen Programme ApE (A Plasmid Editor) und Snapgene Viewer (GSL Biotech LLC) verwendet und darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturen der *Primer* der gewünschten *Annealing*-Temperatur entsprachen. Die genauen Strategien zur Erstellung der *Primer* werden in den entsprechenden Kapiteln näher erläutert. Die fertig konstruierten *Primer* wurden anschließend als unmodifizierte DNA-Oligonukleotide von Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.

Als Polymerase wurde die Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt am Main) mit dem zugehörigen Puffersystem verwendet.

Zur Amplifikation kürzerer DNA-Stücke wurde für jede Reaktion ein Endvolumen von 25 µl angesetzt und bei Bereichen, die (annähernd) dem kompletten Vektor entsprachen, ein Ansatz von 50 µl nach folgendem Schema pipettiert (siehe Tab. 3.1). Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Polymerase und temperaturempfindlichen dNTPs erst direkt vor dem Anstellen der Reaktion zugegeben wurden. Da kurze PCR-Produkte in der Regel durch Agarose-Gelelektrophorese vom DNA-*Template* getrennt wurden, konnte in diesen Ansätzen das *Template* in größerer Menge (unverdünnt) zugegeben werden. Bei langen PCR-Produkten, die auf einem Agarose-Gel nicht vom *Template* abgetrennt werden konnten, wurde dieses hingegen zuerst auf 0,01 µg/µl (in der Regel 1:100) verdünnt, um Verunreinigungen des PCR-Produktes mit der Ausgangs-DNA zu minimieren.

	<i>Insert</i> -PCR	Vektor-PCR
H ₂ O	16,5 µl	32,5 µl
Q5 Reaktionspuffer 5x	5 µl	10 µl
<i>forward</i> -Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl	2,5 µl
<i>reverse</i> -Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl	2,5 µl
DNA-Template	0,2 µl (1 µg/µl)	1 µl (0,01 µg/µl)
dNTPs	0,5 µl	1,0 µl
NEB Q5-Polymerase	0,25 µl	0,5 µl
Gesamt	25 µl	50 µl

Tabelle 3.1 | Reaktionsansätze für PCR

Im Anschluss wurde die PCR nach einem der folgenden Protokolle mit Hilfe des SensoQuest-Lab-cyclers durchgeführt.

Schritt	Temperatur	<i>Insert</i> -PCR	Vektor-PCR
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	3 min
Denaturierung	98 °C	10 sek	10 sek
<i>Annealing</i>	T _M (56 – 65 °C)	20 sek	20 sek
Elongation	72 °C	30 – 120 sek	8 min
Endelongation	72 °C	5 min	5 min
Aufbewahrung	4 °C	∞	∞

Tabelle 3.2 | Standardprotokolle für PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird DNA mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase in mehreren aufeinanderfolgenden Thermozyklen exponentiell vermehrt (Mullis *et al.*, 1986). Im ersten Schritt wird hierfür die DNA bei 98 °C denaturiert, also der Doppelstrang aufgebrochen, sodass sie in Einzelsträngen vorliegt. Anschließend wird die Temperatur wieder soweit abgesenkt, dass sich im zweiten Schritt die *Primer* an die passenden DNA-Stränge anlagern können. Die vorherrschende Temperatur während des sogenannten *Annealing*-Schrittes muss hierbei an die Schmelztemperatur der verwendeten *Primer* angepasst werden. Bei der nachfolgenden Elongation bei 72 °C synthetisiert die Polymerase ausgehend vom *Primer* einen weiteren DNA-Einzelstrang, der komplementär zum *Template* ist. Die Dauer des Elongationsschrittes muss hierbei an die Anzahl der Basenpaare des gewünschten PCR-Produktes angepasst werden. Bei Verwendung der Q5-Polymerase wurde angenommen, dass pro Minute 1–2 kb synthetisiert werden können, sodass dieser Schritt bei einer Vektor-PCR in der Regel 8 min dauerte, während bei einer *Insert*-PCR die Dauer je nach Länge des DNA-Abschnittes 30–120 sek betrug. Durch die zyklische Wiederholung von Denaturierung (98 °C), *Annealing* (T_M) und Elongation (72 °C) (vgl. Abb. 3.1) erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes.

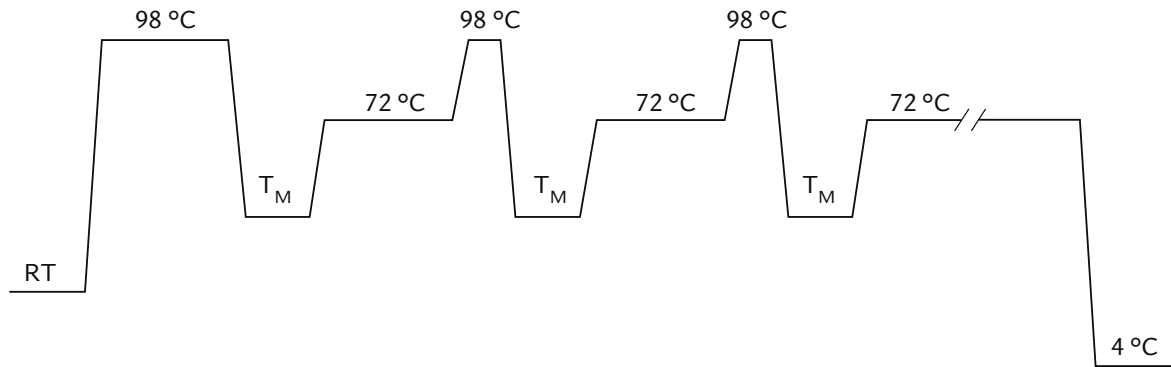


Abbildung 3.1 | Temperaturprofil einer PCR

3.2.2 | Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen in die Aminosäuresequenz eines Proteins wurde eine Mutagenese-PCR basierend auf dem QuikChange®-Protokoll nach Braman *et al.* (1996) durchgeführt. Hierfür wurde ein Mutagenese-*Primer* erstellt, der die gewünschte Mutation enthielt, vor und hinter der Mutationsstelle aber jeweils 13 – 15 Nukleotide aufwies, die komplementär zur Sequenz des Ausgangsplasmids (*Template*) waren, damit der *Primer* an die entsprechende Zielsequenz binden konnte. Hiermit wurde eine Vektor-PCR analog zu Kap. 3.2.1 durchgeführt. Für eine Mutagenese wurde nur ein einziger *Primer* verwendet, während der *reverse-Primer* im Reaktionsansatz durch Wasser ersetzt wurde. Um die Fehlpaarungen des *Primers* auszugleichen, wurde außerdem für die *Annealing*-Phase standardmäßig eine Temperatur von 56 °C verwendet. Folgendes Beispiel zeigt den *Primer* für die Einführung der Mutation K178R in Arr3.

Ausgangssequenz	GTTTGCCCCAGAG	AAA	CCCGGCCCCCAGC
Mutagenese- <i>Primer</i>	TTTGCCCCAGAG	A	CCCGGCCCCCAG

Im Anschluss an die PCR wurde das DNA-Produkt zunächst aufgereinigt. Hierfür wurde der PCR-Reaktionsansatz entweder auf die Säule eines Gel-Extraktionskits gegeben und das PCR-Produkt analog zu Kap. 3.2.6 aufgereinigt oder eine Ethanolfällung durchgeführt. Hierfür wurde die DNA durch das Hinzugeben des 2,5-fachen Volumens Ethanol zum Reaktionsansatz ausgefällt und anschließend für 10 min bei 13.300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vom entstandenen DNA-Pellet abgenommen und dieses getrocknet, ehe es im gewünschten Volumen Wasser gelöst wurde.

Um die für die Mutagenese-PCR eingesetzte *Template*-DNA zu entfernen, wurde zuerst analog zu Kap. 3.2.4 ein Verdau mit dem Enzym DpnI angesetzt. DpnI schneidet spezifisch *dam*-methylierte DNA-Sequenzen, die in von Bakterien amplifizierter DNA wie dem *Template* häufig vorkommen, in PCR-Produkten jedoch nicht. Während das Plasmid mit der Ausgangssequenz von DpnI also in nicht verwertbare Stückchen geschnitten wurde, blieb die durch die Mutagenese-PCR produzierte DNA erhalten und konnte anschließend analog zu Kap. 3.2.11 in NEB® 5-alpha

kompetente *E. coli* (NEB) transformiert werden. Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA einer einzelnen Bakterienkolonie (siehe Kap. 3.2.13.2) wurde der erfolgreiche Einbau der Mutation durch Sequenzierung überprüft.

3.2.3 | Subklonierung

Für den Austausch von DNA-Sequenzen eines bestehenden Plasmids wurde eine Subklonierung durchgeführt. Hierfür wurde ein Plasmid mit dem einzufügenden DNA-Fragment („*Insert*“) und ein Plasmid, in dem eine vorhandene Sequenz durch das Fragment ersetzt werden sollte („*Backbone*“), verwendet. Beispielsweise konnte mit dieser Methode das Fluorophor, mit dem ein Protein markiert war, ausgetauscht werden. Voraussetzung dafür war, dass die zu ersetzende Sequenz im *Backbone* von zwei im Plasmid nur einmal vorkommenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme flankiert wurde. Idealerweise wurden hierfür zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme genutzt, sodass bei der Ligation das *Insert* in der korrekten Richtung eingebaut wurde. Auf diese Weise konnte durch Verdau des *Backbone*-Plasmids mit den entsprechenden Restriktionsenzymen analog zu Kap. 3.2.4 die zu ersetzende Sequenz ausgeschnitten werden. Damit das gewünschte *Insert* später in das *Backbone* eingefügt werden konnte, mussten vor und hinter diesem DNA-Fragment dieselben Schnittstellen vorhanden sein. Wenn dies bereits im Plasmid mit der *Insert*-Sequenz der Fall war, konnte auch dieses analog zu Kap. 3.2.4 verdaut werden und *Backbone* und *Insert* anschließend auf einem Agarosegel analog zu Kap. 3.2.5 aufgetrennt werden (vgl. Abb. 3.2).

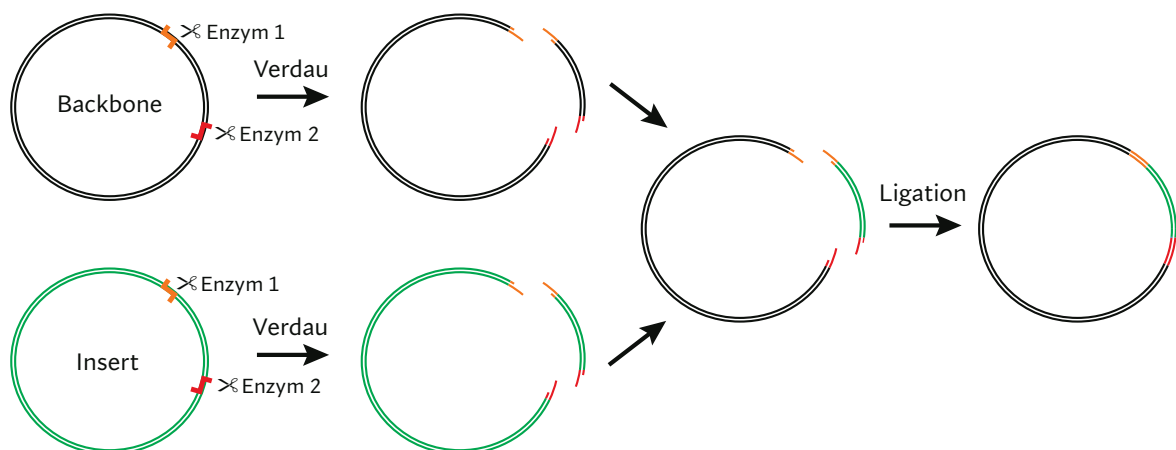


Abbildung 3.2 | Subklonierung mit kompatiblen Schnittstellen für Restriktionsenzyme

Wenn die passenden Schnittstellen im Ausgangsplasmid des Fragments nicht vorhanden waren, mussten die gewünschten Schnittstellen zunächst analog zu Kap. 3.2.1 mit einer *Insert-PCR* an das *Insert* angehängt werden (vgl. Abb. 3.3).

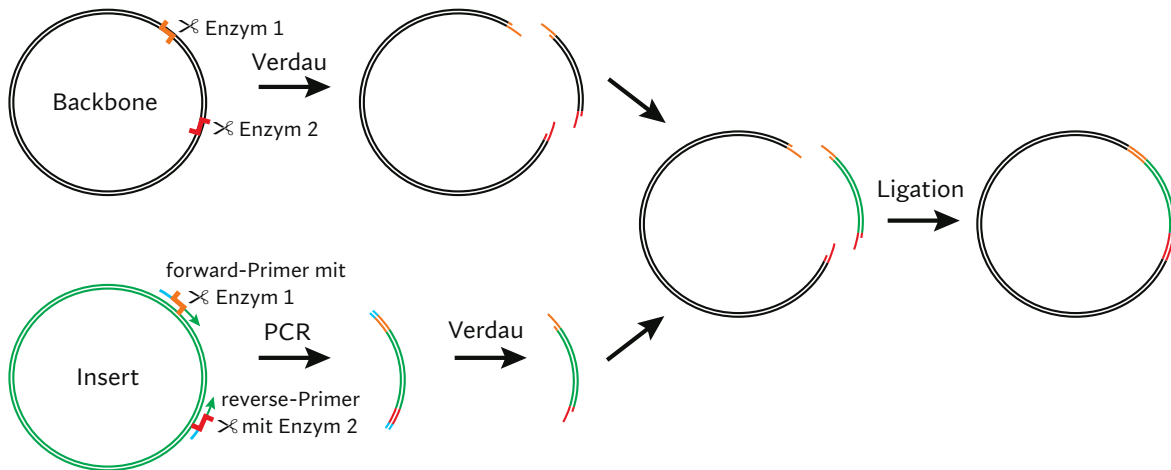


Abbildung 3.3 | Subklonierung mit PCR zum Einfügen von Schnittstellen für Restriktionsenzyme

Je ein *forward*- und *reverse-Primer* wurden dafür so konstruiert, dass sie neben der zum *Insert* komplementären Sequenz mit einer Schmelztemperatur von ca. 60°C an den Enden die gewünschten Schnittstellen sowie zwei Adenosin-Triplets enthielten. Außerdem können in den *Primer* weitere Sequenzen eingebaut werden, die das *Insert* im Zielplasmid flankieren sollen, z.B. Start- oder Stoppcodons. Folgendes Beispiel zeigt den *forward-Primer*, mit welchem der AT₁R N-terminal mit einer HindIII-Schnittstelle versehen wurde .

AAAAAA TCTAGAA T GATTCTCAACTCTTCTACTGAAGATGGTATTA

A-Triplets HindIII Start AT₁R-Sequenz

Das PCR-Produkt wurde daraufhin mittels Ethanolfällung (siehe Kap. 3.2.2) oder unter Verwendung des Gelextraktionskits (siehe Kap. 3.2.6) aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend auf einem Agarosegel analog zu Kap. 3.2.5 vom *Template* abgetrennt.

Die DNA-Fragmente von *Backbone* und *Insert* mussten in jedem Fall aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt werden (siehe Kap. 3.2.6), bevor *Backbone* und *Insert* mittels Ligation analog zu Kap. 3.2.7 verbunden werden konnten. Anschließend wurde das entstandene Plasmid in chemisch kompetente *E. coli* transformiert (vgl. Kap. 3.2.10), aufgereinigt und per Sequenzierung überprüft.

3.2.4 | Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme erkennen und schneiden spezifisch bestimmte Palindrome in doppelsträngiger DNA und können daher für Klonierungen oder zur Überprüfung von DNA-Sequenzen verwendet werden. Für Klonierungen wurden, wie in Tabelle 3.3 dargestellt, meist 3 µg DNA verwendet. War dem Restriktionsverdau eine PCR mit anschließender Aufreinigung vorgeschaltet, wurde das PCR-Produkt mit 16 µl Reinstwasser aus der Gelextraktions-Säule eluiert bzw. das DNA-Pellet nach Ethanolfällung in 16 µl Reinstwasser gelöst, sodass das Gesamtvolumen durch die Zugabe von zwei Enzymen und Puffer auf 20 µl ergänzt wurde. Für einen möglichst vollständigen Verdau der eingesetzten DNA wurde der Ansatz für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss konnten die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.2.5) aufgetrennt und analysiert werden.

DNA (aus Plasmidlösung mit 1 µg/µl)	3 µl
Enzym 1	1 µl
Enzym 2	1 µl
10x Pufferlösung (meist CutSmart)	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 3.3 | Reaktionsansatz für Restriktionsverdau

3.2.5 | Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Gemische unterschiedlicher DNA-Fragmente nach Größe auftrennen, da nach Anlegen eines elektrischen Feldes die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle zur Anode wandern. Das Agarosegel funktioniert hier wie ein Sieb für Moleküle, durch das sich kleinere DNA-Fragmente schneller bewegen können als lange Fragmente. Dafür wurde ein Gel mit Taschen zur Probenbeladung aus 1 % Agarose in TAE-Puffer (m/V) gegossen, indem die Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle im Puffer gelöst wurde. Dem noch flüssigen Gel wurde außerdem ein Tropfen Ethidiumbromid (0,025 %) untergemischt, damit die DNA-Fragmente unter UV-Licht detektiert werden konnten. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer überführt, die mit TAE-Puffer gefüllt war. Die aufzutrennenden DNA-Gemische wurden mit 6x Ladepuffer gemischt, der unter anderem das Beladen der Gel-Taschen durch die Erhöhung der Dichte der Probenflüssigkeit vereinfachte. Anhand des im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffs konnte während der Elektrophorese zudem die Laufweite des Gels verfolgt werden. Zusätzlich wurde in mindestens eine weitere Tasche des Gels eine geeignete DNA-Leiter mit Fragmenten bekannter Größe aufgetragen (100 bp oder 1 kb DNA Ladder, NEB). Anschließend wurden die DNA-Proben bei 80 V für 45–90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte danach unter UV-Licht durch das Ethidiumbromid, das beim Durchlaufen

des Gels in die DNA interkaliert. Wenn die DNA-Fragmente anschließend zur Klonierung weiterverwendet werden sollten, wurden die betreffenden DNA-Banden der gewünschten Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und wie im Kap. 3.2.6 beschrieben isoliert.

3.2.6 | DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder von PCR-Produkten wurde die DNA mit Hilfe des Monarch® DNA Gel Extraction Kits (NEB) aus dem Agarosegel oder Puffer extrahiert. Hierfür wurde das vierfache Gewichts des Agarosefragments an *Dissolve Buffer* zugegeben und das Gelstück durch Inkubation bei 50 °C unter Schütteln aufgelöst. Zur Isolierung von DNA aus Puffergemischen entfiel dieser Schritt. Das Gemisch wurde anschließend auf die dem Kit zugehörige Säule gegeben und für 1 min bei 13.300 U/min zentrifugiert, wobei die DNA-Fragmente an die Säule binden konnten. Durch zweimalige Zugabe von 200 µl *Wash Buffer* und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 13.300 U/min wurde die DNA gewaschen. Die Säule wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß gestellt und 15–20 µL Reinstwasser zur Elution der DNA zugegeben. Die Säule mit dem Wasser wurde zunächst für einige Minuten bei 37 °C inkubiert, ehe die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 13.300 U/min eluiert wurde.

3.2.7 | Ligation von DNA-Fragmenten

Um zwei DNA-Fragmente, die mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut worden waren, zu einem neuen Plasmid zu verbinden, wurde das Enzym T4 DNA-Ligase verwendet. Hierbei waren an den Enden der DNA-Stränge komplementäre einzelsträngige DNA-Überhänge, sogenannte *Sticky ends*, entstanden, sodass sich die zueinander passenden Enden der DNA-Fragmente zusammenlagern konnten. Typischerweise wurde die Ligation wie in Tabelle 3.4 angesetzt und entweder 15 min bei Raumtemperatur, über Nacht bei 16 °C oder über ein Wochenende bei 4 °C inkubiert. Zusätzlich wurde für jede Klonierung eine Religationskontrolle durchgeführt, um zu überprüfen, in welchem Ausmaß sich das *Backbone* ohne *Insert* ligieren ließ. Hierfür wurde das *Insert* durch das gleiche Volumen an Reinstwasser ersetzt (vgl. Tabelle 3.4).

	Ligation	Kontrolle
Insert-Lösung	5 µl	-
Backbone-Lösung	5 µl	5 µl
10x Ligase-Puffer	2 µl	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl	ad 20 µl

Tabelle 3.4 | Reaktionsansatz für Ligation

3.2.8 | Gibson-Assembly

Wenn das Zusammenfügen verschiedener DNA-Sequenzen durch die Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligation nicht möglich war, wurde stattdessen die Gibson-Assembly-Methode verwendet (Gibson *et al.*, 2009). Bei dieser Methode können mehrere DNA-Fragmente ohne das Einfügen von Schnittstellen für Restriktionsenzyme in einer einzigen, isothermalen Reaktion zusammengefügt werden. Statt passender Schnittstellen müssen zwei Fragmente, die vereinigt werden sollen, bei dieser Methode an den Enden eine Überlappung von ca. 20 Basen enthalten. Um diese Überlappung herzustellen, wurde für jedes Fragment eine getrennte PCR durchgeführt, für große DNA-Sequenzen („Vektor“) in einem Ansatz von 50 µl, für kürzere Fragmente („Fragment“) in einem Ansatz von 25 µl.

Primer

Um die überlappenden Enden an die DNA-Sequenzen anzuhängen, wurden für jedes Fragment und den Vektor ein *forward*- und ein *reverse*-Primer so konstruiert, dass diese so viele zum *Template* komplementäre Basen enthielten, dass der *Primer* eine Schmelztemperatur von 60 °C aufwies. An die 5'-Enden der so ermittelten Sequenzen wurden anschließend ca. zehn weitere Basen eingefügt, die wiederum komplementär zu dem DNA-Fragment waren, mit dem das Fragment später zusammengefügt werden sollte. Dadurch entstanden zueinander komplementäre *Primer*-Paare, die insgesamt eine Überlappung von ca. 20 Basenpaaren haben sollten. Die Schmelztemperatur des überlappenden Bereiches sollte mindestens bei 50 °C liegen. Anschließend wurden PCRs analog zu Kapitel 3.2.1 mit einer *Annealing*-Temperatur von 65 °C durchgeführt.

Durchführung

Nach der Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenzen mittels PCR wurden kleine Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.2.5) vom *Template* abgetrennt und die entsprechenden Banden mit Hilfe einer Gelextraktion aus dem Gel extrahiert (siehe Kap. 3.2.6). Das Produkt der Vektor-PCR wurde direkt mittels einer Säule aus dem Gelextraktionskit aufgereinigt und analog zu Kap. 3.2.4 für mindestens 1 h mit DpnI inkubiert, um das *Template* zu verdauen.

Im Anschluss an den Verdau wurde das Restriktionsenzym durch 20-minütige Inkubation bei 80 °C inaktiviert.

Für die Gibson-Assembly-Reaktion wurde zunächst der Gehalt der Fragmente und des Vektors gemessen und die Länge der DNA-Abschnitte ermittelt. Die Fragmente wurden meist in 2-fachem molaren Überschuss zum Vektor zugegeben, bei Fragmentlängen unter 200 bp hat sich hingegen ein 5-facher Überschuss bewährt. Der Ansatz wurde mit Reinstwasser auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl NEB Hifi DNA Assembly Mastermix 2x gemischt (vgl. Tabelle 3.5). Dieser Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 50 °C inkubiert.

Vektor	100 ng
Fragment	2 – 5x molarer Überschuss
NEB Hifi DNA Assembly Master Mix 2x	10 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 3.5 | Reaktionsansatz für Gibson-Assembly

Das hier verwendete NEBuilder HiFi DNA Assembly-Kit (NEB) ist ein Gemisch aller für die Gibson-Reaktion benötigten Enzyme. Eine 5'-Exonuklease verkürzt die 5'-Enden der DNA-Stränge und erzeugt so einzelsträngige Überhänge. Durch die an die Fragmente und den Vektor angefügten überlappenden Bereiche können sich nun die überstehenden Enden der unterschiedlichen DNA-Stränge aneinanderlagern. Eine DNA-Polymerase füllt die übrigen Lücken auf und eine DNA-Ligase verbindet zuletzt alle Unterbrechungen im DNA-Rückgrat. Abbildung 3.4 zeigt schematisch den Ablauf einer Gibson-Reaktion.

Im Anschluss an die Gibson-Reaktion konnte der Ansatz in *E. coli* transformiert werden, wobei chemisch kompetente Zellen verwendet wurden, wenn ein Vektor mit nur einem Fragment verbunden werden sollte. Für mehrere Fragmente je Vektor wurden jedoch NEB® 5-alpha kompetente *E. coli* (NEB) eingesetzt. Auch hier wurde nach der DNA-Präparation mittels Sequenzierung überprüft, ob die Klonierung erfolgreich war.

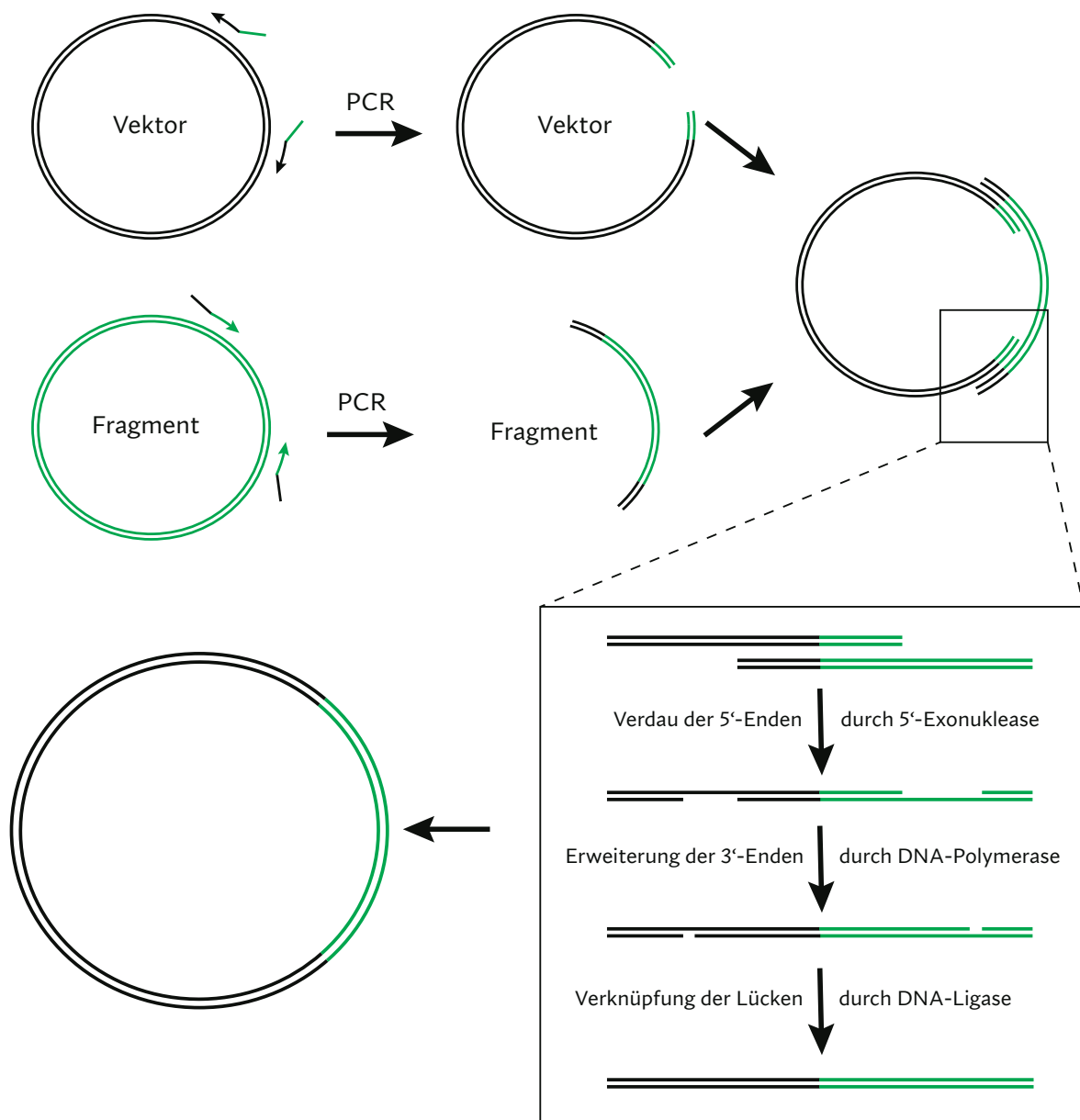


Abbildung 3.4 | Schematischer Ablauf eines Gibson-Assemblays

3.2.9 | Generierung chemisch kompetenter *E. coli*

Da *Escherichia coli*-Bakterien normalerweise nicht in der Lage sind, Plasmid-DNA aus der umgebenden Flüssigkeit aufzunehmen, müssen für Transformationen spezielle kompetente Bakterien verwendet werden. Chemisch kompetente *E. coli* wurden hierfür aus NEB® 5-alpha *Competent E. coli* nach dem Protokoll von Chung *et al.* (1988) hergestellt. Zunächst wurden die 5-alpha kompetenten *E. coli* zum Vereinzeln auf einer antibiotikafreien LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde am nächsten Tag zunächst in eine Vorkultur von 10 ml LB-Medium überführt, die über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert wurde. Mit 5–10 ml dieser Vorkultur wurde dann eine Kultur von 250 ml LB-Medium angeimpft und bei

37 °C unter Schütteln so lange inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,6 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Bakterien bei 5000 U/min und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und anschließend in 25 ml gekühltem TSB-Puffer (siehe Kap. 2.8.2) resuspendiert. Die so entstandene Bakteriensuspension wurde in Eppendorfgefäße aliquotiert, zunächst für 1–2 h auf Eis inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die fertigen chemisch kompetenten *E. coli* wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.10 | Transformation kompetenter *E. coli* mit TSB/KCM

Zur Transformation der hergestellten Plasmide in selbst generierte chemisch kompetente *E. coli* wurden analog zu Chung *et al.* (1988) 80 µl eines DNA-Reinstwassergemisches (bestehend aus 0,2 µg Plasmid-DNA und 79,8 µl Reinstwasser für Retransformationen, 5 µl Ligaseansatz und 75 µl Reinstwasser nach Ligationen oder 2 µl Gibson-Ansatz und 78 µl Reinstwasser bei Gibson-Assembly) mit 20 µl 5x KCM-Puffer (siehe Kap. 2.8.2) vermischt und 100 µl chemisch kompetente *E. coli* hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde zunächst für 20 min auf Eis und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 1 ml antibiotikafreies LB-Medium zugegeben wurde und alles im Thermomixer für 30–60 min bei 37 °C mit 600 U/min geschüttelt wurde. Zuletzt wurden die Bakterien auf einer LB-Agarplatte, die das dem Vektor entsprechende Selektionsantibiotikum enthielt (z.B. Ampicillin für pcDNA3-Vektoren), ausplattiert. Für Retransformationen wurden hierfür 20 µl der *E. coli*-Mischung auf eine Agarplatte gegeben und mit einem sterilisierten Drigalskispatel ausgestrichen. Bei anderen Klonierungen wurden die Bakterien zunächst durch kurze Zentrifugation (20 sek, 13.300 U/min) pelletiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl verworfen und die *E. coli* vorsichtig in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurde die gesamte Suspension mit Hilfe des sterilisierten Drigalskispatels auf der Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.11 | Transformation kompetenter *E. coli* mittels Hitzeschock

Für Klonierungen, bei denen kein vollständiges Plasmid entstanden war (z.B. bei einer Mutagenese) oder welche anspruchsvoller waren (z.B. Gibson-Assembly mit mehreren Fragmenten), wurden NEB® 5-alpha kompetente *E. coli* verwendet und diese entsprechend der Herstellerangaben mittels Hitzeschock transformiert. Hierfür wurden 2 µl eines Mutageneseansatzes oder 0,5 µl aus einem Gibson-Assembly-Ansatz mit 12,5 µl kompetenten *E. coli* gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C im Thermomixer, woraufhin der Ansatz erneut für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Danach wurden 250 µl SOC-Medium (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) oder LB-Medium zugegeben und alles für 30–60 min bei 37 °C mit 600 U/min geschüttelt. Danach wurde die Bakteriensuspension vollständig auf einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.12 | Herstellung von LB-Medium und LB-Agar-Platten

Zur Herstellung von flüssigem LB-Medium zur Kultivierung von Bakterien wurden 100 g LB-Medium-Pulver nach Lennox (AppliChem) in 5 l Reinstwasser gelöst, je 500 ml in eine Flasche gefüllt und direkt autoklaviert.

Für LB-Agarplatten wurden 250 ml LB-Medium mit 3,75 g Agar in eine Flasche gegeben, ein Rührfisch hinzugefügt und alles autoklaviert. Bei Bedarf konnte die Agarmasse in der Mikrowelle verflüssigt werden, mit dem benötigten Selektionsantibiotikum in der gewünschten Konzentration versetzt werden und anschließend in sterile Kunststoff-Petrischalen gegossen werden. Nach dem Abkühlen und Aushärten wurden die fertigen Agarplatten bei 4 °C gelagert.

3.2.13 | DNA-Präparationen

Die Präparation plasmidischer DNA aus bakteriellen Einzelkolonien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Je nach isolierter DNA-Menge wurden Mini-Präparationen (für kleine Mengen, Kap. 3.2.13.1) oder Midi-Präparationen (für größere Mengen, Kap. 3.2.13.2) unterschieden. Bei beiden Methoden wurden die Bakterien durch Zugabe des Tensids SDS (*Sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) und die alkalische Verseifung der Lipide durch Zugabe von Natriumhydroxid lysiert. Die Alkalisierung des pH-Wertes führte außerdem dazu, dass die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den komplementären DNA-Strängen gelöst wurden. Nach Neutralisation des pHs durch Kaliumacetat/Essigsäure war nur die kürzere Plasmid-DNA in der Lage, vollständig zu renaturieren, während die längere chromosomale DNA zusammen mit denaturierten Proteinen und anderen Zelltrümmern sowie ausgefälltem Kaliumdodecylsulfat abzentrifugiert werden konnte. Die Plasmid-DNA im Überstand konnte anschließend durch Adsorption an ein Silicagel zusätzlich gereinigt werden, ehe sie eluiert und durch Zugabe von Alkoholen wie Ethanol oder Isopropanol, die der DNA die Hydrathülle entzogen, ausgefällt wurden. Nach Entfernung der alkoholischen Bestandteile und anschließendem Trocknen wurde die DNA in Reinstwasser gelöst.

3.2.13.1 | Mini-Präparation

Zur Aufreinigung geringer DNA-Mengen, beispielsweise um die Plasmid-DNA mehrerer Kolonien mittels Kontrollverdau zu screenen, wurde eine Mini-Präparation durchgeführt, da diese schneller und kostengünstiger war als Midi-Präparationen. Hierfür wurden zunächst auf einer Agarplatte gewachsene Kolonien einzeln in Zentrifugierröhrchen mit 4 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 1,5 ml jeder entstandenen Bakteriensuspension wurden dann in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 13.300 U/min abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert, anschließend 200 µl Lösung 2 und 2 µl RNase A (10 mg/ml) hinzugefügt, alles gut gemischt und für wenige Minuten bei Raumtempera-

tur inkubiert (Zusammensetzung der Lösungen siehe Kap. 2.8.2). Anschließend wurden 150 µL eiskalte Lösung 3 hinzugefügt, erneut gemischt und für 10 min bei 13.300 U/min zentrifugiert. 400 µL des Überstandes, der die renaturierten Plasmide enthielt, wurden zur Ausfällung der DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in welches 1 ml Ethanol vorgelegt wurde. Nach gründlichem Mischen wurde erneut für 10 min bei 13.300 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das DNA-Pellet getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in 16 µL Reinstwasser gelöst und analog zu Kap. 3.2.4 ein Kontrollverdau durchgeführt, bevor die entstandenen DNA-Fragmente mit Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.2.5) aufgetrennt und analysiert werden konnten. Wenn ein Klon das gewünschte Bandenmuster aufwies, das bei einer erfolgreichen Klonierung entstehen sollte, wurde mit dem Rest der Bakteriensuspension aus dem Zentrifugierröhrchen eine Übernachtskultur für eine Midi-Präparation (siehe Kap. 3.2.13.2) angeimpft.

3.2.13.2 | Midi-Präparation

Für die Aufreinigung größerer DNA-Mengen wurde eine Midi-Präparation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Dazu wurde eine Bakterienkolonie von der Agarplatte in einem großen Erlenmeyer-Kolben in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 4.500 U/min vom Medium abgetrennt und das Pellet in 4 ml Puffer P1 (Resuspensionspuffer) resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml Puffer P2 (Lysepuffer) hinzugegeben, gründlich gemischt, bis die Lösung homogen blau gefärbt war und alles für 4 min inkubiert. Danach wurden 4 ml Puffer P3 (Neutralisierungspuffer) zugegeben, erneut gemischt, bis die Lösung wieder farblos war und die ausgefallenen Zellbestandteile für 30 min bei 5000 U/min und 4 °C abzentrifugiert. In dieser Zeit wurde die zum Kit gehörende Anionenaustauschersäule mit 4 ml QBT-Puffer (Equilibrationspuffer) vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA auf die Säule gegeben, wo die negativ geladene DNA anhaften konnte und anschließend durch zweimalige Zugabe von 10 ml QC-Puffer (Waschpuffer) gewaschen wurde. Danach wurde die DNA mit 5 ml QF-Puffer (Elutionspuffer) in ein kleines Zentrifugierröhrchen eluiert, in welches 3,5 ml Isopropanol vorgelegt wurden. Die ausgefallene DNA wurde nach gründlichem Mischen der Flüssigkeiten durch Zentrifugation für 30 min bei 5000 U/min und 4 °C pelletiert und mit 2 ml Ethanol 70 % gewaschen, um z.B. Salze zu entfernen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 5.000 U/min und 4 °C wurde das DNA-Pellet vollständig getrocknet, ehe es in 100 µL Reinstwasser gelöst wurde.

3.2.14 | Messung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentration und Reinheit einer Plasmidlösung wurde mit Hilfe eines Nanophotometers (NanoDrop, Implen) bestimmt. Hierfür wurde die Extinktion der Lösung bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm gegen Reinstwasser als Blindprobe gemessen und die Konzentration der DNA sowie verschiedene Faktoren zur Bestimmung von Verunreinigungen ermittelt. Da DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm hat, wurde mit der Absorption bei dieser Wellenlänge die Konzentration der Lösung bestimmt. Der Quotient A_{260}/A_{280} zeigt an, ob die DNA-Lösung mit Proteinen, RNA oder auch Alkoholresten kontaminiert ist. Bei einer möglichst reinen DNA-Lösung sollte dieses Verhältnis zwischen 1,8 und 1,9 liegen, während höhere Werte für eine Verunreinigung mit RNA und niedrigere Werte für eine Verunreinigung mit Proteinen sprechen. Der Quotient A_{260}/A_{230} sollte idealerweise über 2 liegen, um eine übermäßige Verunreinigung mit Polysacchariden auszuschließen. Die Absorption der Lösung bei 320 nm sollte möglichst gering sein, da dies auf unlösliche Partikel hinweist. Bei ausreichender Reinheit wurde die Plasmidkonzentration nach einer DNA-Präparation auf 1 µg/µl eingestellt.

3.2.15 | Sequenzierung

Um eindeutig zu bestimmen, ob eine Klonierung erfolgreich war, wurden alle DNA-Plasmide im Anschluss an die Midi-Präparation sequenziert. Hierzu wurde 1 µg DNA mit Reinstwasser auf 15 µl verdünnt. Die Sequenzierung wurde von Eurofins Genomics per Sanger-Methode durchgeführt und die Sequenzierdaten mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) oder SnapGene Viewer überprüft. Meistens wurden für die Sequenzierung von Eurofins Genomics zur Verfügung gestellte Standardprimer verwendet, z.B. CMV-fw, pcDNA3-rv oder pEGFPN1-rv. Wenn eine Sequenzierung der zu überprüfenden DNA-Stelle mit einem der Standardprimer nicht möglich war, wurde ein eigener *Primer* verwendet. Hierfür wurden 2 µl *Primer*-Lösung (10 pmol/µl) direkt zur Plasmidlösung, die sequenziert werden sollte, hinzugegeben.

3.3 | Biophysikalische Methoden

3.3.1 | Fluoreszenzmikroskopie

3.3.1.1 | Allgemeines

Fluoreszenzmikroskopie ist eine Sonderform der Lichtmikroskopie, die sich die Eigenschaft fluoreszierender Verbindungen zunutze macht, nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge spontan Licht einer längeren Wellenlänge zu emittieren. Durch die selektive Markierung der zu untersuchenden Zellbestandteile mit Fluorochromen können diese ohne störenden Einfluss des umgebenden Gewebes oder anderer Zellstrukturen visualisiert werden, da das aufgenommene Bild nur durch die gewünschte Fluoreszenz erzeugt wird. Durch die Möglichkeit, Fluorochrome in Form von fluoreszierenden Proteinen genetisch zu codieren und mit verschiedenen Proteinen zu fusionieren, ohne deren Funktion merklich zu beeinflussen, lässt sich nicht nur die Lokalisation, sondern sogar die Dynamik und das Verhalten dieser Proteine in lebenden Zellen untersuchen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden eingesetzt, die auf der Fluoreszenzmikroskopie basieren.

3.3.1.2 | Fluoreszierende Proteine

Der Prototyp der fluoreszierenden Proteine wurde im Jahr 1962 in Form des GFPs (*green fluorescent protein*) aus der Quallenart *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962) von Osamu Shimomura entdeckt. Die Möglichkeit der Expression von GFP oder fluoreszierender Fusionsproteine in lebenden Zellen war ein Durchbruch für die Zellbiologie (Chalfie *et al.*, 1994) und durch zielgerichtete Mutation der Aminosäuresequenz konnten nicht nur die Eigenschaften des GFPs stetig verbessert werden, sondern auch andersfarbige fluoreszierende Proteine hergestellt werden.

GFP und davon abgeleitete fluoreszierende Proteine bestehen aus einer zylinderartigen β -Barrel-Struktur aus elf β -Faltblättern, die eine kurze α -Helix umgeben, in der sich das Chromophor befindet. Das Chromophor selbst entsteht durch autokatalytische Cyclisierung und Oxidation aus einer Tripeptidsequenz (Heim *et al.*, 1994), die im Wildtyp-Protein aus Ser65, Tyr66 und Gly67 besteht. Die dicht gepackte Struktur des β -Barrels schützt das Chromophor vor unerwünschten Einflüssen der umgebenden Flüssigkeit und intramolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und den nach innen ragenden Seitenketten beeinflussen die Photostabilität, Leuchtintensität und Farbe des fluoreszierenden Proteins.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten fluoreszierender Proteine verwendet, vor allem solche Modifikationen, die cyan (z.B. CFP, *cyan fluorescent protein*), gelb (z.B. YFP, *yellow fluorescent protein*), grün (z.B. GFP) oder rot (z.B. mCherry) fluoreszieren. Die einzelnen Untervarianten werden in den entsprechenden Kapiteln genauer vorgestellt.

3.3.1.3 | Allgemeiner Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

Das größte Problem der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass das emittierte Fluoreszenzlicht in der Regel nur sehr schwach ist und vom deutlich stärkeren Anregungslicht überstrahlt werden würde. Daher muss durch spezielle Filter und Strahlenteiler sichergestellt werden, dass nur das vom Präparat abgestrahlte Licht betrachtet wird. Durch zusätzliche Verwendung weiterer Filter für das Anregungslicht wird außerdem dafür gesorgt, dass das Präparat nur mit Licht der richtigen Wellenlänge beleuchtet wird.

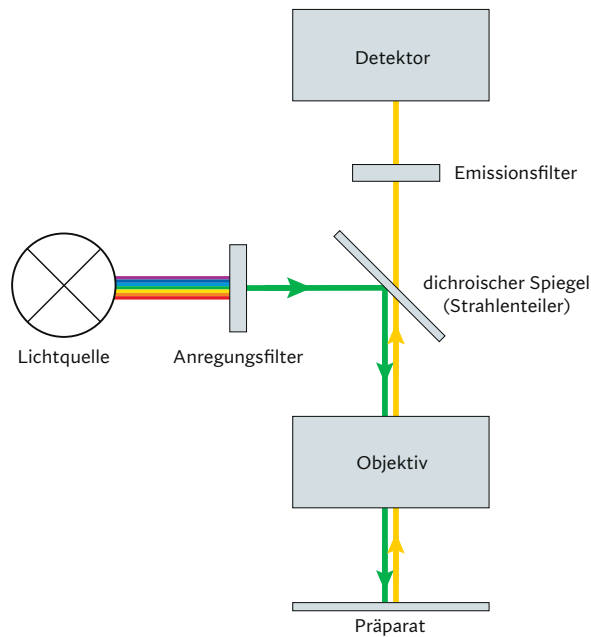


Abbildung 3.5 | Allgemeiner schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

Der in Abbildung 3.5 gezeigte Grundaufbau eines Fluoreszenzmikroskops entspricht im Prinzip dem eines normalen Hellfeldmikroskops. Als Lichtquellen werden meist sehr helle Gasentladungslampen (z.B. Quecksilber-Höchst-Drucklampen) oder Laser bzw. LEDs, die von vornherein nur Licht definierter Wellenlängen abgeben, eingesetzt. Der Wellenlängenbereich, mit dem das Präparat angeregt werden soll, wird durch optische Filter isoliert und mit Hilfe eines dichroischen Spiegels durch das Objektiv zum Präparat geleitet. Die im Präparat vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe strahlen daraufhin längerwelliges Fluoreszenzlicht ab, das durch das Objektiv gesammelt wird und den dichroischen Spiegel passiert. Dieser fungiert als Strahlenteiler und lässt nur das vom Fluorophor emittierte Licht passieren, das daraufhin zum Detektor oder Okular weitergeleitet wird. Die Eigenschaften der verwendeten Filter und Spiegel müssen genau auf die jeweiligen Fluorophore abgestimmt werden und als Detektor kann je nach Anwendungszweck z.B. eine Kamera oder ein elektronischer Verstärker (*Photomultiplier*) eingesetzt werden. Da diese aufgrund der besseren Lichtempfindlichkeit meist nur Graustufen detektieren können, müssen bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Fluorophore mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben die entsprechenden Wellenlängenbereiche z.B. durch einen weiteren Strahlenteiler voneinander separiert werden.

3.3.2 | FRET-Experimente

3.3.2.1 | Grundlagen des Förster-Resonanz-Energie-Transfers

Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet die strahlungsfreie Übertragung von Energie von einem Farbstoffmolekül (Donor) auf ein benachbartes weiteres Farbstoffmolekül (Akzeptor) und wurde zuerst im Jahr 1948 von Theodor Förster beschrieben (Förster *et al.*, 1948). Wenn Fluorophore sowohl als Donor als auch als Akzeptor dienen, wird FRET manchmal auch als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer bezeichnet, auch wenn der eigentliche Energietransfer nicht über Fluoreszenz, sondern strahlungslos stattfindet. In diesem Fall wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zuerst das Donorfluorophor angeregt, das einen Teil der absorbierten Energie über Dipol-Dipol-Interaktionen auf ein Akzeptorfluorophor überträgt, dessen Anregungsspektrum im Vergleich zum Donor ins längerwellige Spektrum verschoben ist. Das Akzeptorfluorophor kann daraufhin die aufgenommene Energie in Form von Strahlung wieder abgeben. Dadurch lässt sich Akzeptorfluoreszenz beobachten, obwohl dieses Fluorophor nicht direkt angeregt wurde. Da die FRET-Effizienz sehr stark vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängt, können mit dieser Methode zum Beispiel Abstandsänderungen zwischen zwei fluoreszenzmarkierten Molekülen gemessen werden. Durch die Markierung von Proteinen mit Fluorophoren wie GFP-Varianten (siehe Kap. 3.3.1.2) lassen sich daher Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen in Echtzeit mit einer Auflösung im Millisekundenbereich beobachten (Truong und Ikura, 2001).

3.3.2.2 | Voraussetzungen für FRET

Damit es zu einer Energieübertragung zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor kommen kann, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein.

Am wichtigsten ist hierbei der Abstand der beiden Fluorophore, der weniger als 100 Å (10 nm) betragen muss (Stryer, 1978). Dass die relative Distanz von Donor und Akzeptor eine so große Rolle spielt, lässt sich anhand folgender Formel nachvollziehen, nach welcher die Effizienz der Energieübertragung von der sechsten Potenz der Entfernung der beiden Fluorophore abhängt:

$$E = \frac{1}{1 + \frac{r^6}{R_0^6}}$$

Hierbei stellt E die FRET-Effizienz, r den tatsächlichen Abstand zwischen Donor und Akzeptor und R_0 den sogenannten Förster-Radius dar, der den Abstand zweier Fluorophore bezeichnet, bei dem die FRET-Effizienz für dieses Fluorophor-Pärchen genau 50 % beträgt. Diese Kennziffer liegt für gebräuchliche Fluorophor-Paare in der Regel zwischen 4 und 7 nm, für die häufig verwendete Kombination von eCFP und eYFP beträgt sie 4,9 nm (Bajar *et al.*, 2016). Größere Abstände zwischen Donor und Akzeptor führen zu einer Abnahme der FRET-Effizienz, geringere Distanzen zu einer erhöhten Effizienz der Energieübertragung (siehe Abb. 3.6)

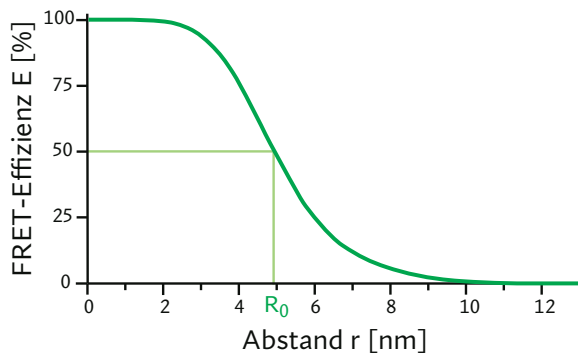


Abbildung 3.6 | FRET-Effizienz

Darstellung des Zusammenhangs zwischen FRET-Effizienz E und Abstand r zwischen Donor und Akzeptor. Als Förster-Radius R_0 wurden 4,9 nm angenommen.

Der Förster-Radius ist wiederum abhängig von der Quantenausbeute des Donors ohne Energietransfer (Q_0), dem Dipol-Orientierungsfaktor (κ), dem Brechungsindex (n) des Mediums bei den für den Energietransfer relevanten Wellenlängen und dem Integral aus den sich überlappenden Spektren von Donor und Akzeptor (J):

$$R_0^6 = 8,8 * 10^{-28} * \frac{\kappa^2 * Q_0 * J}{n^4}$$

Der Orientierungsfaktor κ beschreibt in der Formel die relative Orientierung der Dipole des Donors und des Akzeptors. Stehen Donor und Akzeptor genau parallel zueinander, hat κ^2 einen Wert von 4, bei einer senkrechten Anordnung beträgt $\kappa^2 = 0$. Daraus folgt, dass kein FRET stattfinden kann, wenn Donor und Akzeptor orthogonal zueinander stehen, selbst wenn die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe sind. Da als Fluorophore in dieser Arbeit ausschließlich fluoreszierende Proteine verwendet wurden, die meist an flexible Strukturen der Zielproteine gekoppelt wurden, können Donor- und Akzeptorfluorophor prinzipiell alle möglichen relativen räumlichen Anordnungen aufweisen. In derartigen biologischen Anwendungsformen nimmt κ^2 daher einen Mittelwert aus allen möglichen Orientierungsfaktoren an (Shrestha *et al.*, 2015). Bei der Etablierung eines FRET-Assays muss daher die Positionierung der Fluorophore am jeweiligen Zielprotein experimentell getestet werden, um eine möglichst hohe FRET-Effizienz zu erreichen.

Die dritte Voraussetzung für FRET ist eine spektrale Überlappung des Emissionsspektrums des Donorfluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (siehe Abb. 3.7). Dies lässt sich durch die Auswahl geeigneter Fluorophor-Paare erreichen, wie zum Beispiel bei der Verwendung des prototypischen FRET-Paares aus CFP und YFP bzw. Varianten der beiden fluoreszierenden Proteine (siehe auch Kap. 3.3.2.4)

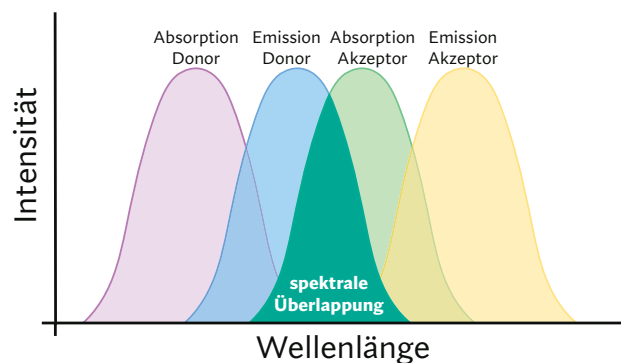


Abbildung 3.7 | Spektrale Überlappung

Darstellung der spektralen Überlappung des Absorptions- und Emissionsspektrums von fiktiven Donor- und Akzeptor-Fluorophoren.

3.3.2.3 | Mikroskop für FRET-Messungen

Alle FRET-Experimente in dieser Arbeit wurden in Einzelzellen bei Raumtemperatur an einem invertierten Mikroskop (Axiovert 100; Zeiss) unter Verwendung eines 60x Ölimmersionsobjektivs (PlanApo N 60x/1.45 Oil; Nikon) durchgeführt. Die Anregung der Fluorophore erfolgte durch LED-Lichtquellen (pE-100; CoolLED) bei 440 nm mit einer Intensität von 10% bzw. einer Intensität von 4% bei 500 nm. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde eine *high-performance* CCD-Kamera (Spot Pursuit, Spot Imaging/Diagnostic Instruments) verwendet. Zur Auswahl von Zellen sowie zur Direktanregung des YFPs wurde ein Filterblock mit Dualband-Filtern (Semrock, Anregung 416, 501; Emission 440, 520) eingesetzt (Abb. 3.8 B). Während der FRET-Messungen, bei denen nur CFP angeregt wurde, wurde der Filterblock mit Langpass-Strahlenteiler (Semrock, 458 LP) verwendet (Abb. 3.8 A). Die Emissionen von CFP und YFP bei unterschiedlichen Wellenlängen wurden mit Hilfe eines Zwei-Wege-Bildteilers (Optosplit) aufgetrennt und nebeneinander auf einem Schwarz-Weiß-Kamerasensor aufgenommen.

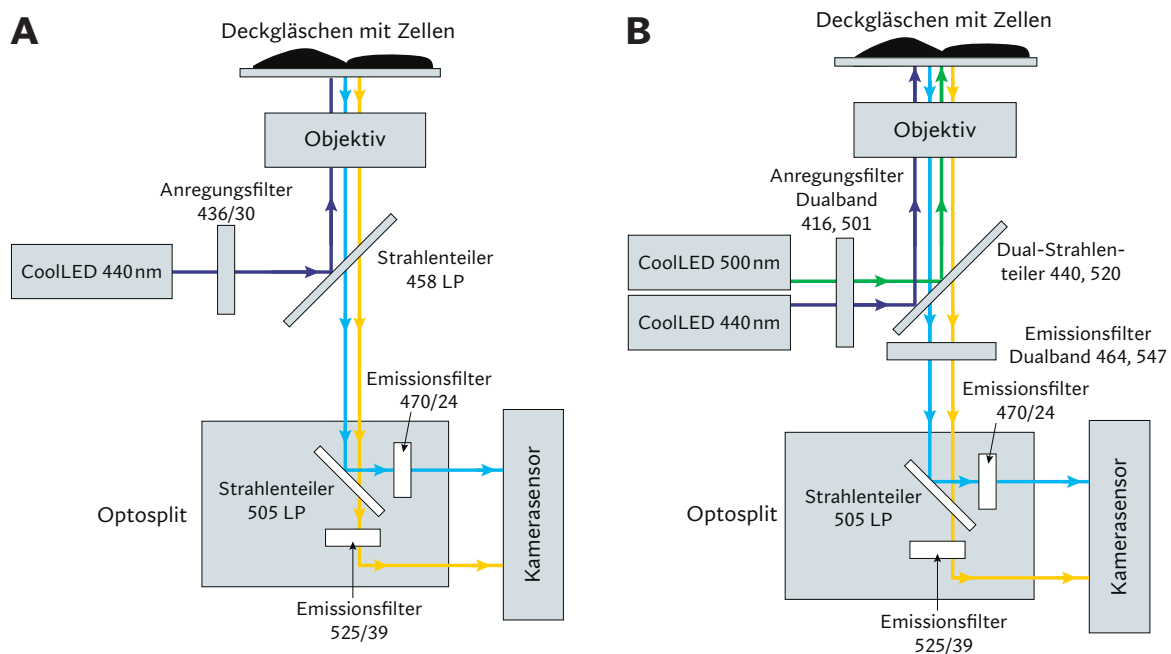


Abbildung 3.8 | Schematischer Aufbau des FRET-Mikroskops

A Strahlengang im Messmodus; **B** Strahlengang im CFP-YFP-Modus

3.3.2.4 | Fluorophore – Falschanregung und Durchbluten

Als Fluorophore wurden bei der Durchführung von FRET-Experimenten ausschließlich CFP- (eCFP, mTurquoise) und YFP-Varianten (eYFP, mVenus) verwendet. Diese Fluorophore zeigen nicht nur die erforderliche spektrale Überlappung, sondern passen auch zu den im Mikroskop verwendeten Filtern und Strahlenteilern (siehe Abb. 3.9).

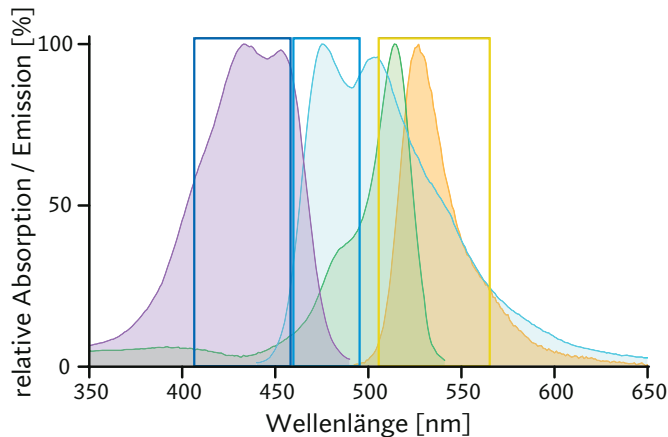


Abbildung 3.9 | Fluorophor-Spektren

Darstellung der Exzitations- und Emissionsspektren von CFP (violett bzw. hellblau) und eYFP (grün bzw. orange). Eingerahmt sind die durch Strahlenteiler und Anregungs- bzw. Emissionsfilter begrenzten Wellenlängen, die zur Anregung (violett) und zur Messung der Emission von CFP (blau) und YFP (gelb) verwendet werden. Die Daten der Spektren wurden www.chroma.com/spectra-viewer entnommen.

Falschanregung & Durchbluten

Wie in Abbildung 3.9 zu erkennen ist, besitzen CFP und YFP jeweils sehr breite Exzitations- und Emissionsspektren. Es lässt sich daher nicht vermeiden, dass trotz geeigneter Filter die verwendete Wellenlänge, die hauptsächlich CFP anregt, in geringerem Ausmaß auch YFP anregt, was in einer YFP-Emission unabhängig von FRET resultiert. Dieses Artefakt wird als Falschanregung bezeichnet. Außerdem erlaubt der Strahlenteiler keine exakte Trennung der CFP- und YFP-Emission, sodass zu einem gewissen Anteil auch die Emission des Donors im Akzeptor-Kanal detektiert. Dieser als Durchbluten bezeichnete Effekt führt dazu, dass fälschlicherweise eine zu hohe YFP-Fluoreszenz gemessen wird.

Sowohl Falschanregung als auch Durchbluten führen dazu, dass die YFP-Emission überschätzt wird und müssen daher durch Korrekturfaktoren ausgeglichen werden. Zur Quantifizierung der Falschanregung wurde mit Hilfe von Zellen, die ausschließlich ein mit YFP markiertes Protein exprimierten, die prozentuale Falschanregung durch die CFP-Anregungswellenlänge im Verhältnis zur direkten Anregung des YFPs bei 500 nm bestimmt. Die resultierenden Fluoreszenzintensitäten wurden jeweils im YFP-Detektionskanal detektiert und der Korrekturfaktor wie folgt berechnet:

$$\text{Korrekturfaktor Falschanregung} = \frac{F_{\text{YFP}} \text{ angeregt bei } 440 \text{ nm}}{F_{\text{YFP}} \text{ angeregt bei } 500 \text{ nm (direct YFP)}}$$

Der Korrekturfaktor für das Durchbluten wurde bestimmt, indem Zellen, die ausschließlich ein CFP-markiertes Protein exprimierten, bei 440 nm angeregt und die Fluoreszenzintensitäten im CFP- und YFP-Detektionskanal gemessen wurden. Der Korrekturfaktor wurde wie folgt berechnet und lag in dieser Arbeit bei ca. 40 %.

$$\text{Korrekturfaktor Durchbluten} = \frac{F_{YFP}}{F_{CFP}}$$

Mit Hilfe der beiden Korrekturfaktoren konnte von der zu hoch gemessenen YFP-Emission bei der Auswertung jeder Zelle die fälschlicherweise detektierte Falschanregung und das Durchbluten subtrahiert werden. Zur Berechnung der korrigierten YFP-Emission wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{korr. YFP} = F_{YFP} - \text{Korrekturfaktor Durchbluten} * F_{CFP} - \text{Korrekturfaktor Falschanregung} * \text{direct YFP}$$

3.3.2.5 | Durchführung und Auswertung von FRET-Messungen am Mikroskop

Unmittelbar vor der Messung wurde ein bewachsenes Deckgläschen in eine Attofluor-Messkammer (Invitrogen) eingespannt und einmal mit FRET-Puffer (siehe Kap. 2.8.3) gespült, um Reste des Nährmediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit FRET-Puffer überschichtet und auf dem Objektisch des Mikroskops befestigt. Durch ein Druckluft-Perfusionssystem (VC3-8xP Series; ALA Scientific Instruments) wurden die gemessenen Einzel- oder Doppelzellen während der Messung kontinuierlich mit FRET-Puffer oder den entsprechenden Rezeptoragonisten (gelöst in FRET-Puffer) umspült. Dieses System ermöglichte es, innerhalb von wenigen Millisekunden die die Zelle umgebende Lösung auszutauschen und somit Agonist-vermittelte FRET-Änderungen zu beobachten. Die Konzentration des Agonisten und die Dauer der Agoniststimulation ist in jedem FRET-Diagramm durch Balken über den Graphen angegeben. Die zu messenden Zellen wurden zunächst im CFP-YFP-Modus danach ausgewählt, dass die CFP- und YFP-Fluoreszenz ausreichend hell leuchtete und die fluoreszierenden Fusionsproteine in den richtigen Zellkompartimenten lokalisiert waren (z.B. Rezeptoren an der Plasmamembran, Arr3 im Cytosol). Während der Messung selbst wurde das Präparat mit 60 ms langen Lichtpulsen in der CFP-Anregungswellenlänge mit einer Frequenz von 1 Hz (sofern nicht anders angegeben) beleuchtet.

Auswertung

Die CFP- und YFP-Emissionen wurden gleichzeitig in einer *Region of interest* (ROI) um die zu messende Zelle sowie in einer Hintergrund-ROI aufgezeichnet, sodass bei der Auswertung von der Fluoreszenzintensität jedes Messpunkts die entsprechende Hintergrundfluoreszenz subtrahiert werden konnte. Von der YFP-Intensität wurden zusätzlich Falschanregung und Durchbluten (siehe oben) abgezogen. Nach der eigentlichen Messung jeder Zelle wurde hierfür die totale YFP-Expression durch direkte Anregung der YFP-Fluoreszenz bei 500 nm ermittelt (*direct YFP*). Abbildung 3.10 A zeigt einen typischen Graphen, der aus einer FRET-Messung von fluoreszenzmarkiertem Arr3-

tin-3 und fluoreszierenden Rezeptoren (hier: μ OR) resultiert. Stimulation der Rezeptoren durch Agonistlösung (hier: 10 μ M DAMGO) induzierte eine Interaktion der beiden Proteine, sodass es zur Energieübertragung vom Donorfluorophor auf das Akzeptorfluorophor kam, was in einer verminderten Donorfluoreszenz (F_{CFP}) und gleichzeitig einer gesteigerten Akzeptorfluoreszenz (F_{YFP}) resultierte. Wurde der Agonist durch Umspülen der Zelle ausgewaschen, dissoziierte Arrestin-3 wieder vom Rezeptor ab und der Energietransfer zwischen den Fluorophoren wurde unterbunden. Die Intensitäten der Einzelfluoreszenzen von Donor und Akzeptor kehrten dadurch zurück zu den Ausgangswerten. Die Graphen der korrigierten Einzelfluoreszenzen verlaufen beim Auftreten von FRET also immer gegenläufig. Zur besseren Visualisierung wurde aus den einzelnen Fluoreszenzintensitäten die Emissionsratio ($F_{\text{YFP}}/F_{\text{CFP}}$) nach der folgenden Formel ermittelt und ebenfalls als Graph aufgetragen (Abb. 3.10 B).

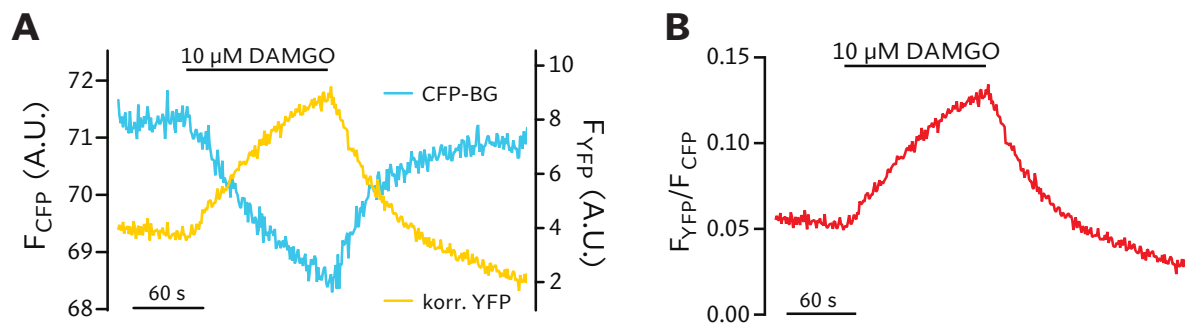


Abbildung 3.10 | Repräsentative FRET-Messung

A Korrigierte Einzelfluoreszenz-Emissionen von CFP und YFP während einer FRET-Messung der Interaktion zwischen Arr3-mTurq und μ OR-mVenus

B Resultierende Emissionsratio $F_{\text{YFP}}/F_{\text{CFP}}$ aus der Messung in A

Bleichkorrektur

Da die fluoreszierenden Proteine während der Messung mit Lichtpulsen hoher Intensität bestrahlt wurden, kam es dabei unweigerlich zu einem photochemischen Vorgang, bei dem die Fluorophor-Moleküle während der Exposition mit Anregungslicht zerstört wurden und dadurch ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz verloren (Song *et al.*, 1995). Dieser als Photobleichen bezeichnete Prozess beeinflusste die beiden verwendeten fluoreszierenden Proteine meist jedoch nicht im gleichen Ausmaß, sodass es zu einer Verschiebung der *Baseline* kam. Dies wurde korrigiert, indem mit Hilfe von OriginPro 2018 (OriginLab, Northampton, USA) eine monoexponentielle oder lineare Funktion ermittelt wurde, die vom gesamten Graphen subtrahiert wurde (siehe Abb. 3.11)

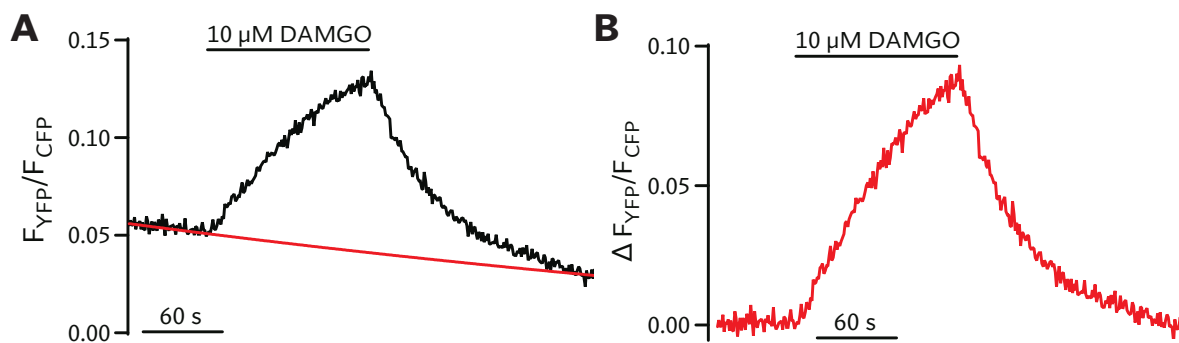


Abbildung 3.11 | Durchführung der Bleichkorrektur

A Durch die *Baseline* der repräsentativen FRET-Messung aus Abb. 3.10 wurde eine monoexponentielle Kurve (rot) gelegt und anschließend von den gesamten Daten abgezogen.

B Resultierendes Ergebnis nach der *Baseline*-Korrektur der in A dargestellten Kurve.

Auswertung von Kinetiken

In dieser Arbeit wurden FRET-Messungen durchgeführt, um die Geschwindigkeit der Arrestin-Dissoziation vom verwendeten Rezeptor zu ermitteln. Die Bestimmung dieser Kinetik wurde durchgeführt, indem mit Hilfe von GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc) für jede FRET-Messung eine monoexponentielle Kurve ermittelt wurde, die dem Abfall der Emissionsratio im entsprechenden Abschnitt des Agonist-Auswaschens möglichst genau entsprach (Abb. 3.12)

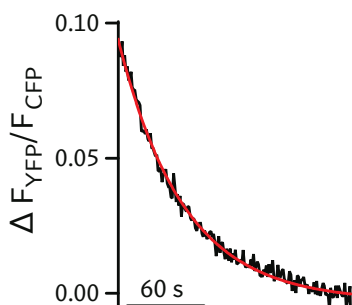


Abbildung 3.12 | Bestimmung der Auswaschkinetik

Durch die Auswaschphase nach Agoniststimulation der repräsentativen FRET-Messung aus Abb. 3.11 wurde eine monoexponentielle Kurve (rot) gelegt.

Die Berechnung der monoexponentiellen Kurve basiert auf folgender Gleichung:

$$Y = (Y_0 - \text{Plateau}) * \exp(-k * x) + \text{Plateau}$$

Hierbei steht „Plateau“ für den y-Wert bei $x = \infty$, und k für die Geschwindigkeitskonstante. Die erhaltenen k -Werte einer Messreihe wurden gesammelt und durch statistische Tests zwischen unterschiedlichen Bedingungen verglichen.

Um die Dissoziationskinetiken mehrerer Bedingungen graphisch besser vergleichen zu können, wurden die Emissionsverhältnisse der Einzelmessungen mit folgender Formel zwischen 0 und 1 normalisiert:

$$y = \frac{(F_{YFP}/F_{CFP}) - (F_{YFP}/F_{CFP})_{\min}}{(F_{YFP}/F_{CFP})_{\max} - (F_{YFP}/F_{CFP})_{\min}}$$

$(F_{YFP}/F_{CFP})_{\min}$ entspricht hierbei dem Mittelwert der letzten fünf Messpunkte vor Agonistzugabe und $(F_{YFP}/F_{CFP})_{\max}$ dem Mittelwert der letzten fünf Messpunkte des bei der Agoniststimulation entstandenen Plateaus vor dem Auswaschen.

3.3.2.6 | FRET-Messungen im Tecan Spark (Plattenreader)

Um FRET-Messungen nicht nur in Einzelzellen, sondern im 96-Well-Format durchführen zu können, kam das Plattenlesegerät Tecan Spark (Tecan) zum Einsatz. Hierbei konnten nicht nur die Fluoreszenzintensitäten mehrerer Zellen pro Well untersucht werden, sondern im Gegensatz zu den Experimenten am Mikroskop konnte durch den Tecan Spark die Temperatur, bei der die Zellen während der Messung inkubiert wurden, auf den gewünschten Wert eingestellt werden. Für die Arbeiten am Plattenlesegerät wurden transient transfizierte HEK293T-Zellen auf eine PLL-beschichtete 96-Well-Platte mit transparentem Boden gesplittet. Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die gewünschte Zellzahl (meist 120.000) in die einzelnen Reservoirs überführt und mit 200 µl Nährmedium kultiviert. Unmittelbar vor der Messung eines Reservoirs wurde das Nährmedium abgenommen, mit 200 µl FRET-Puffer gewaschen und die Zellen mit 80 µl FRET-Puffer überschichtet. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten der adhären Zellen erfolgte hierbei vom Boden eines Wells, weshalb die Z-Höhe an jedes einzelne Well angepasst werden musste und somit pro Durchlauf nur ein Reservoir vermessen werden konnte. Anschließend wurde die Messung mit dem Tecan Spark gestartet. Zur Zugabe des Agonisten wurde die 96-Well-Platte vom Gerät herausgefahren, sodass 20 µl Agonistlösung manuell in das jeweilige Well pipettiert werden konnte. Die Detektion von CFP und YFP erfolgte hier nicht gleichzeitig, sondern sequentiell, wobei die Zellen zur Anregung beider Fluoreszenzen mit Licht der Wellenlänge 430 ± 10 nm bestrahlt wurden. Die Emission der CFP-Fluoreszenz wurde alle 10 s (soweit nicht anders angegeben) bei 460–480 nm und die Fluoreszenz des YFPs bei 540–560 nm aufgenommen.

Auswertung

Zur Analyse der gewonnenen Daten wurden die Werte für YFP um das Durchbluten korrigiert (vgl. Kap. 3.3.2.4) und anschließend aus korrigierten YFP-Daten sowie den Einzelwerten für CFP das Emissionsratio (YFP/CFP) gebildet. Um die einzelnen Messreihen besser vergleichen zu können, wurde für jede Einzelmessung der erste Wert nach der Agonistinjektion von allen anderen Werten des jeweiligen Reservoirs subtrahiert und anschließend alle Messreihen einer Bedingung zusammengefasst. Die so entstandenen Werte der Emissionsratio wurden als Graph gegen die Zeit aufgetragen und der Zeitpunkt der Agonistzugabe durch einen Pfeil hervorgehoben (siehe Abb. 3.13)

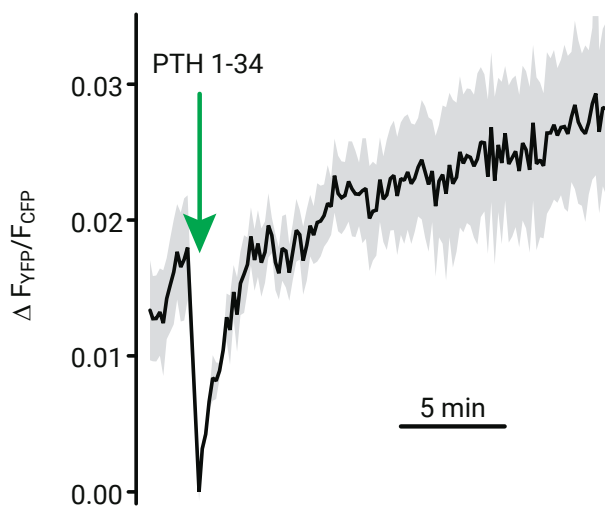


Abbildung 3.13 | Repräsentative FRET-Messung mit dem Tecan Spark

Emissionsratio von YFP und CFP während einer FRET-Messung der Interaktion zwischen Arr3-CFP und Ub-YFP nach Aktivierung von überexprimiertem PTHR.

3.3.3 | BRET-Experimente

3.3.3.1 | Grundlagen des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers

Auch beim Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) findet, ähnlich wie bei FRET (siehe Kap. 3.3.2.1), eine strahlungsfreie Übertragung von Energie statt. Im Gegensatz zu FRET stammt diese Energie allerdings nicht aus dem Anregungslicht, das von einem Donorfluorophor absorbiert wurde, sondern sie entsteht durch Biolumineszenz bei einer enzymatischen Reaktion, zum Beispiel der Oxidation eines Luziferins durch eine Luziferase (Newman *et al.*, 2011). Als Luziferine bezeichnet man niedermolekulare Substanzen, die von speziellen Enzymen, sogenannten Luziferasen, unter Emission von Photonen umgesetzt werden. Für diese Reaktion werden Sauerstoff und in manchen Fällen auch Cofaktoren wie ATP oder bestimmte Elektrolyte benötigt. Das dabei entstehende Produkt befindet sich zunächst in einem energiereichen, angeregten Zustand, aus dem es nach wenigen Nanosekunden in den Grundzustand fällt und die freiwerdende Energie in Form eines Lichtquanten abgibt. Statt der Emission von Biolumineszenz kann die Energie auch strahlungsfrei auf ein benachbartes Fluorophor mit dem passenden Anregungsspektrum übertragen werden, das daraufhin zu fluoreszieren beginnt. Auch das im Kapitel 3.3.1.2 beschriebene

fluoreszierende Protein GFP aus der Quallenart *Aequorea victoria* wird durch die Emission von Energie durch das Photoprotein Aequorin zum Leuchten gebracht. Durch die Fusion einer Luziferase an ein Zielprotein kann analog zu FRET die Interaktion mit einem zweiten fluoreszenzmarkierten Protein in Echtzeit gemessen werden (Xu *et al.*, 1999).

Da bei BRET kein Anregungslicht benötigt wird, bietet diese Methode gegenüber FRET einige Vorteile. So wird durch das Fehlen einer externen Lichtquelle keine Autofluoreszenz angeregt, was das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert. Außerdem können die als Akzeptor verwendeten Fluorophore nicht durch Falschanregung direkt angeregt werden (vgl. Kapitel 3.3.2.4) und es kann bei der Nutzung von Biolumineszenz nicht zum Photobleichen des Donors kommen (Newman *et al.*, 2011). Analog zur Messung von FRET-Signalen wird bei BRET die Emission von Biolumineszenz des Donors und die Fluoreszenz des Akzeptors in getrennten Kanälen gemessen. Wenn sich Luziferase und Akzeptorfluorophor in räumlicher Nähe befinden, wird die Energie strahlungsfrei auf das Fluorophor übertragen, das zu leuchten beginnt. Dies resultiert in einer Zunahme der Akzeptorfluoreszenz, während die Emission von Photonen durch die Luziferase abnimmt. Trennen sich die Proteine, an welche Fluorophor und Luziferase fusioniert wurden, so findet kein Energietransfer mehr statt und die Energie wird vom Donor stattdessen in Form von Lumineszenz abgegeben, wohingegen die Fluoreszenz des Akzeptors abnimmt. Dies kann analog zu FRET als Emissionsratio dargestellt werden.

3.3.3.2 | Luziferasen und Substrate

Es gibt eine Reihe von Organismen, die jeweils artspezifische Luziferasen produzieren und zur Biolumineszenz verwenden. Die meisten für die Messung von BRET eingesetzten Luziferasen basieren auf der aus der Seefeder *Renilla reniformis* stammende Luziferase Rluc (Lohse *et al.*, 2012). Durch gezielte Mutationen wurden zum Beispiel die Helligkeit und die Quantenausbeute deutlich verbessert. Neben diesen Rluc-Varianten sind außerdem die *Firefly*-Luziferase Fluc aus dem Glühwürmchen (Smirnova und Ugarova, 2015) oder die aus der Tiefseegarnele *Oplophorus gracilirostris* stammende NanoLuc® (Nluc) (Hall *et al.*, 2012) im Einsatz. Letztere hat den Vorteil, dass sie nicht nur heller als die übrigen Luziferasen, sondern vor allem deutlich kleiner als diese ist (19 kDa statt ca. 36 kDa).

Ähnlich zu FRET müssen die verwendeten Akzeptorfluorophore selbstverständlich danach ausgewählt werden, dass die von der Luziferase freigesetzte Energie bzw. deren Emissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors zusammenpassen. Sehr weit verbreitet ist die Nutzung fluoreszierender Proteine wie GFP und YFP als Akzeptorfluorophore (Lohse *et al.*, 2012), doch es gibt auch Alternativen wie das HaloTag, das oft als Akzeptor zusammen mit Nluc verwendet wird. Das HaloTag ist ein kleines Protein, welches an das Zielprotein fusioniert werden kann und eine irreversible kovalente Bindung mit einem speziell entwickelten fluoreszierenden Liganden eingeht, der schlussendlich als Akzeptor fungiert (England *et al.*, 2016).

Da die Freisetzung von Biolumineszenz auf der enzymatischen Umsetzung eines Luziferins, auch als Substrat bezeichnet, beruht, wurde auch das Luziferin im Laufe der Zeit stetig weiterentwickelt und verbessert. Während in ersten Versuchen noch das natürliche Substrat der *luc*, Coelenterazin, verwendet wurde, gibt es inzwischen verschiedene Varianten davon, die auf die verwendete Luziferase-Variante angepasst werden muss. Dazu gehört zum Beispiel das als Deep-BlueC[®] bekannte Coelenterazin 400A (Lohse *et al.*, 2012) oder Furimazin, das bevorzugt zusammen mit *Nluc* eingesetzt wird und im Vergleich zum ursprünglichen Coelenterazin deutlich stabiler ist und weniger Autolumineszenz produziert (Hall *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurde eine *Nluc*-Luziferase zusammen mit Coelenterazin H und YFP-Varianten als Akzeptorfluorophore eingesetzt.

3.3.3.3 | Durchführung und Auswertung von BRET-Experimenten

Auf 6 cm-Schalen kultivierte HEK293T-Zellen wurden ca. 24 h nach der transienten Transfektion auf eine PLL-beschichtete 96-Well-Platte (siehe Kap. 3.1.4) gesplittet. Hierfür wurde die gewünschte Anzahl an Zellen (meist 500) in jedes einzelne Well überführt und mit insgesamt 200 µl Nährmedium kultiviert. Unmittelbar vor der Messung eines Reservoirs wurde das Nährmedium abgenommen, mit 200 µl FRET-Puffer mit 0,1 % BSA-Zusatz (BSA-FRET-Puffer) gewaschen und die Zellen dann mit 80 µl BSA-FRET-Puffer und 0,25 µg Substrat überschichtet. Anschließend wurde die Messung mit dem Tecan Spark gestartet. Zur Zugabe des Agonisten wurde die 96-Well-Platte vom Gerät herausgefahren, sodass 20 µl Agonistlösung manuell in die jeweiligen Reservoirs, die gerade gemessen wurden, pipettiert werden konnten. Die Emission der *Nluc*-Luziferase wurde bei 415–470 nm und die Fluoreszenz des Akzeptors bei 520–700 nm alle 30 sek (soweit nicht anders angegeben) gemessen. Die Verwendung des Tecan Spark ermöglichte es nicht nur, in jedem Reservoir mehrere Zellen auf einmal zu messen, sondern pro Durchlauf sogar Werte für mehrere Reservoirs (z.B. eine Spalte) aufzunehmen.

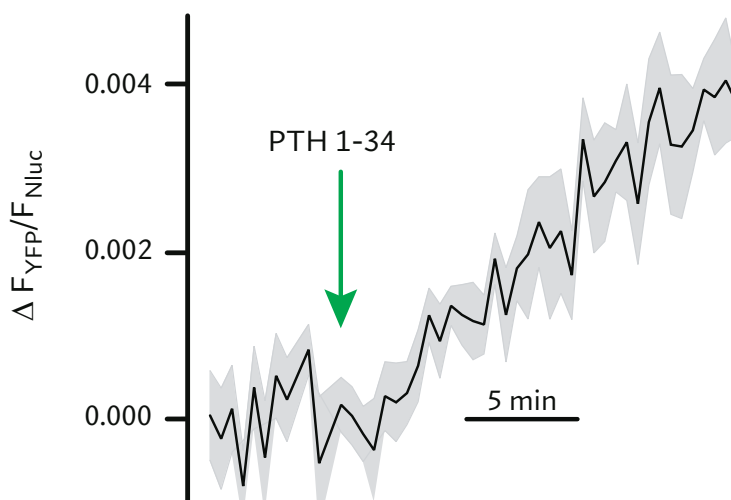


Abbildung 3.14 |
Repräsentative BRET-Messung

Emissionsratio von YFP und *Nluc* während einer BRET-Messung der Interaktion zwischen Arr3-*Nluc* und Ub-YFP nach Aktivierung des überexprimierten PTHR.

Auswertung

Zur Analyse der gewonnenen Daten wurde aus den Einzelwerten für Nluc und YFP die Emissionsratio ($F_{\text{YFP}}/F_{\text{Nluc}}$) gebildet. Um die einzelnen Messreihen besser vergleichen zu können, wurde für jede Einzelmessung der erste Wert nach der Agonistinjektion von allen anderen Werten des jeweiligen Reservoirs subtrahiert. Anschließend wurden alle Messreihen einer Bedingung zusammengefasst. Die so entstandene Emissionsratio wurde als Graph gegen die Zeit aufgetragen und der Zeitpunkt der Agonistzugabe durch einen Pfeil hervorgehoben (siehe Abb. 3.14)

3.3.4 | Konfokalmikroskopie

3.3.4.1 | Allgemeines

Im Gegensatz zur konventionellen (Weitfeld-)Fluoreszenzmikroskopie wird bei konfokaler Mikroskopie das Präparat nicht komplett, sondern immer nur ein kleiner Punkt beleuchtet. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz immer nur in einem kleinen Bereich angeregt, wodurch störendes Streulicht von Strukturen außerhalb der Fokusebene minimiert werden kann und dadurch die Auflösung und der Kontrast deutlich verbessert wird. Der Lichtfleck wird nach und nach über das Präparat geleitet und daraus schließlich ein Bild konstruiert.

Durch die Verwendung von Lochblenden (engl. *Pinholes*) im Strahlengang des Mikroskops vor dem Detektor und nach der Lichtquelle gelangt Licht, das nicht der Schärfeebene im Präparat entstammt (siehe Abb. 3.15, roter Lichtstrahl), größtenteils nicht zum Detektor, sondern es wird nur das Emissionslicht auf den Detektor geleitet, das der Z-Ebene im Fokus entspricht (siehe Abb. 3.15, grüner Lichtstrahl). Dies wird dadurch erreicht, dass der Punkt in der Lochblende und

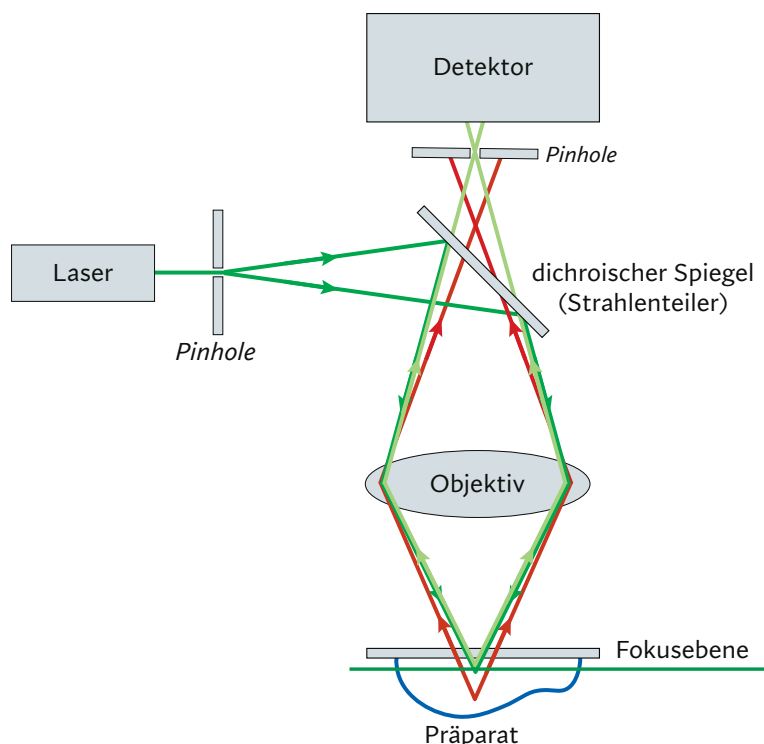


Abbildung 3.15 | Schematischer Aufbau eines Konfokalmikroskops

Emissionslicht, welches der Fokusebene entspringt (grüner Lichtstrahl) wird durch das *Pinhole* auf den Detektor fokussiert, während Licht von außerhalb der Fokusebene (roter Lichtstrahl) größtenteils nicht zum Detektor gelangt.

der beleuchtete Punkt in der Schärfeebene gleichzeitig im Fokus, also konfokal zueinander sind. Durch das Abrastern einer Ebene des Präparats entsteht ein sogenannter optischer Schnitt, der es ermöglicht, auch in dickeren Präparaten hochaufgelöste, scharfe Bilder der zu untersuchenden Strukturen aufnehmen zu können. Die Größe des *Pinholes* lässt sich meist frei einstellen und ist entscheidend dafür, wie viel Licht von außerhalb der Schärfeebene aufgenommen wird, welche Dicke also der optische Schnitt hat. Die kleinstmögliche Öffnung der Lochblende wird als 1 *Airy Unit* (AU) bezeichnet und ist abhängig von der numerischen Apertur und Vergrößerung des Objektivs sowie von den Wellenlängen des Lichtes.

3.3.4.2 | Colokalisation

Durch die Möglichkeit, das Präparat in dünne optische Sektionen zu unterteilen, lässt sich die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Strukturen besonders genau beurteilen. Dies ist vor allem dann von Interesse, wenn durch konfokale Aufnahmen untersucht werden soll, ob zwei oder mehrere fluoreszierende Proteine sehr nah beieinander liegen bzw. im selben zellulären Kompartiment vorhanden sind, was als Colokalisation bezeichnet wird. Dies wird dadurch nachgewiesen, dass mit verschiedenfarbigen Fluorophoren markierte Proteine im selben Pixel eines Bildes vorhanden sind.

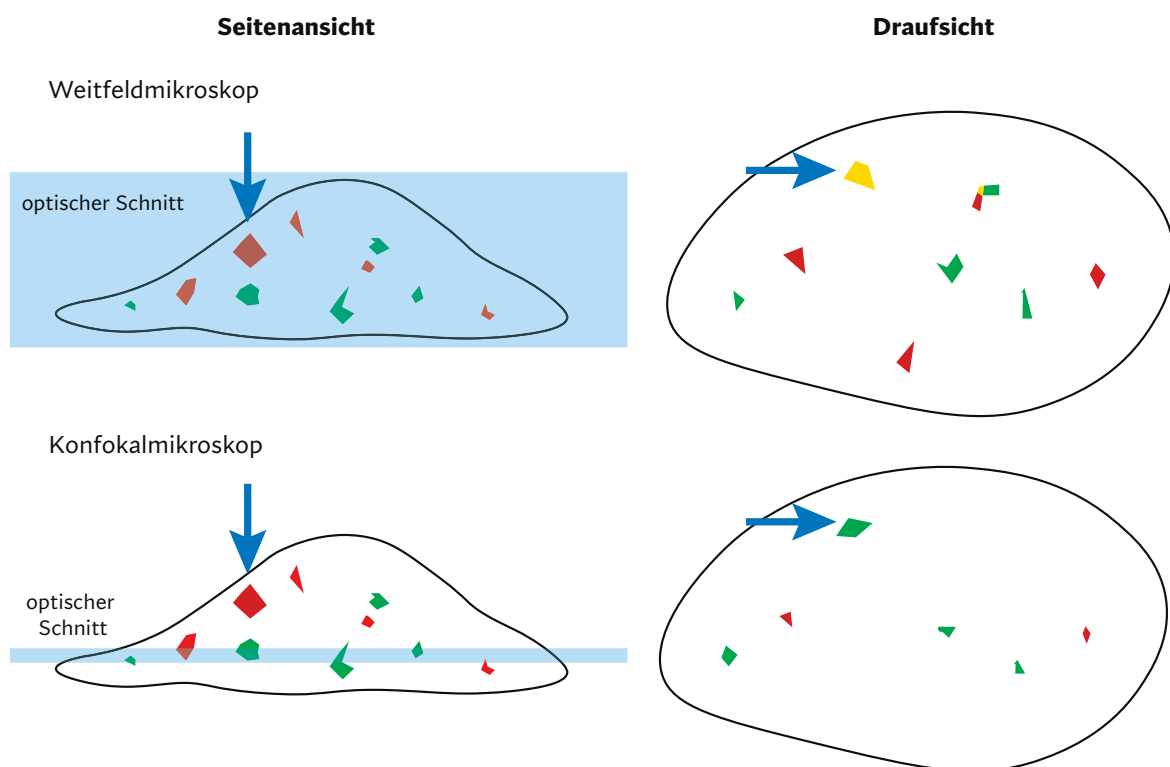


Abbildung 3.16 | Vergleich von Weitfeldfluoreszenz- und Konfokalmikroskopie

Bei der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie wird die gesamte Z-Höhe der Zelle aufgenommen, sodass Signale, die übereinander liegen (siehe Pfeile) nicht getrennt voneinander detektiert werden können, obwohl sie nicht in direkter räumlicher Nähe liegen. Bei Verwendung eines Konfokalmikroskops wird hingegen nur eine geringe Z-Höhe der Zelle analysiert, sodass die mit Pfeilen markierten Signale getrennt werden können.

Da bei der Konfokalmikroskopie jeder Pixel des aufgenommenen Bildes eigentlich die Fluoreszenz eines dreidimensionalen Bereichs enthält, wird stattdessen auch oft der Begriff Voxel verwendet. Legt man die Bilder der Einzelfluoreszenzen – meist wird hierfür grün und rot verwendet – übereinander, so werden die Pixel, in denen beide Farben gleichzeitig und in gleicher Intensität vorhanden sind, umgefärbt – bei grün und rot zu gelb, bei anderen Farbkombinationen meist zu weiß. Abbildung 3.16 verdeutlicht, warum ein Weitfeldfluoreszenzmikroskop für eine solche Analyse der Colokalisation verschiedener Proteine in einer Zelle dem Konfokalmikroskop deutlich unterlegen ist. Da mit einem Weitfeldmikroskop das komplette Präparat beleuchtet wird, können Strukturen in unterschiedlichen Ebenen nicht unterschieden werden, während mit dem Konfokalmikroskop fluoreszierend markierte Strukturen außerhalb der Schärfenebene nicht aufgenommen werden.

Zur Quantifizierung der Colokalisation zweier Proteine wurde in dieser Arbeit der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Dieser Koeffizient ist ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen und kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Nimmt der Korrelationskoeffizient einen Wert von 1 an, so liegt ein perfekt linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen vor, was für die Colokalisation bedeutet, dass zwei Proteine das exakt gleiche Verteilungsmuster im untersuchten Bereich besitzen. Liegt der Wert hingegen bei -1 , so sind die beiden Variablen perfekt invers miteinander korreliert, während Werte um 0 bedeuten, dass es keinerlei Korrelation zwischen den beiden Variablen gibt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wird nach folgender Formel berechnet:

$$r_p = \frac{\sum ((R_i - R_{\text{avg}})(G_i - G_{\text{avg}}))}{\sqrt{\sum (R_i - R_{\text{avg}})^2 \sum (G_i - G_{\text{avg}})^2}}$$

Hierbei bezeichnen R_i und G_i die Intensitäten einzelner Voxel beispielsweise im roten bzw. grünen Kanal und R_{avg} bzw. G_{avg} die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten in den beiden Kanälen. Da von jedem Einzelwert die durchschnittliche Signalintensität abgezogen wird, wird der Pearson-Korrelationskoeffizient nicht durch deutlich unterschiedliche Gesamtintensitäten der beiden Kanäle oder Hintergrundfluoreszenz verfälscht.

3.3.4.3 | Konfokalmikroskop

In dieser Arbeit wurden alle konfokalen Experimente an einem Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop durchgeführt. Dieses war ausgestattet mit einem λ blue x63/1.4 NA-Ölobjektiv (Leica) und verschiedenen Lasern unterschiedlicher Wellenlängen, mit denen die im Präparat vorkommenden Fluorophore angeregt werden konnten. In dieser Arbeit wurden je nach eingesetzten Fluorophoren ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 405 nm und einer Leistung von 50 mW , ein Argonlaser, von dessen vier Anregungswellenlängen nur 488 nm und 514 nm (beide mit 20 mW) benutzt wurden, und ein Helium-Neon-Laser (HeNe) mit einer Wellenlänge von 543 nm und einer Leistung von 1 mW verwendet. Die Öffnung der Lochblende wurde in dieser Arbeit ausschließlich auf 1 Airy Unit gestellt, was für das verwendete Objektiv einem Durchmesser von $95,52\text{ }\mu\text{m}$ entsprach.

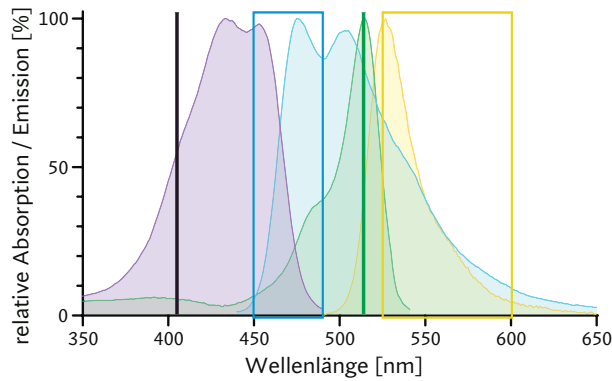


Abbildung 3.17 |
Fluorophor-Spektren CFP & YFP

Darstellung der Exzitations- und Emissionsspektren von CFP (violett bzw. blau) und eYFP (grün bzw. orange). Die Anregungswellenlängen sind durch violette (405 nm) bzw. grüne (514 nm) Linien angezeigt, die Wellenlängenbereiche, die zur Detektion verwendet wurden, sind blau (CFP) und gelb (YFP) eingerahmt. Die Daten der Spektren wurden www.chroma.com/spectra-viewer entnommen.

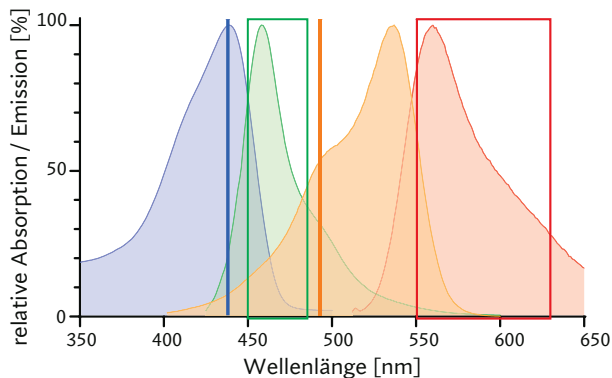


Abbildung 3.18 |
Fluorophor-Spektren GFP & mCherry

Darstellung der Exzitations- und Emissionsspektren von GFP (blau bzw. grün) und mCherry (orange bzw. rot). Die Anregungswellenlängen sind durch blaue (488 nm) bzw. orangefarbene (543 nm) Linien angezeigt, die Wellenlängenbereiche, die zur Detektion verwendet wurden, sind grün (GFP) und rot (mCherry) eingerahmt. Die Daten der Spektren wurden www.chroma.com/spectra-viewer entnommen.

Um eine zu große Überschneidung der Anregungs- und Emissionsspektren zu vermeiden, wurde grundsätzlich eine Kombination von CFP- und YFP-Varianten, meist mTurquoise und YFP, oder GFP zusammen mit mCherry verwendet (vgl. Abb. 3.17 & Abb. 3.18).

Als Strahlenteiler wurde für die gleichzeitige Aufnahme von blauer und gelber Fluoreszenz ein RT30/70-Würfel eingesetzt, für grüne und rote Fluoreszenz ein DD-488/543-Strahlenteiler. Das vom Präparat ausgehende Emissionslicht wurde dabei durch den Strahlenteiler geleitet und anschließend durch ein Prisma nach den Wellenlängen aufgefächert. Durch flexible Spiegel und Spaltblenden konnte der gewünschte zu detektierende Wellenlängenbereich frei gewählt werden (siehe Abb. 3.19). Das Emissionslicht, das die Spaltblenden passieren konnte, wurde durch mehrere *Photomultiplier* registriert und die Intensität des gesamten einfallenden Lichts für jeden Pixel an den PC weitergeleitet. Diese sensitiven Detektoren sind nötig, da bei der Konfokalmikroskopie für einen Pixel nur sehr wenig Fluoreszenzlicht emittiert wird. Diese gesamte Detektionsvorrichtung ermöglichte es, dass mehrere Fluorophore gleichzeitig beobachtet werden konnten und für jedes davon der optimale Wellenlängenbereich für das Emissionslicht detektiert wurde.

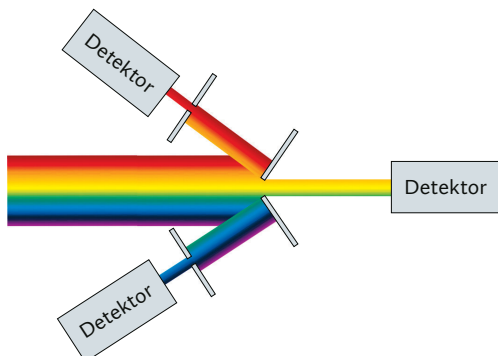


Abbildung 3.19 |
Schematische Darstellung der Detektoreinheit

Das nach Wellenlängen aufgefächerte Licht wird durch flexible Spaltblenden und Spiegel auf die einzelnen Detektoren (= *Photomultiplier*) geleitet.

3.3.4.4 | Durchführung und Auswertung

Zur Beurteilung der Lokalisation fluoreszierender Arrestine nach der Stimulation verschiedener Rezeptoren wurden transient transfizierte Zellen auf PLL-beschichtete Deckgläschen gesplittet. Zur Stimulation der Zellen wurde ein Deckgläschen in eine Attofluor-Messkammer (Invitrogen) eingespannt, einmal vorsichtig mit FRET-Puffer gewaschen und mit 1 ml FRET-Puffer, in dem der verwendete Agonist in der gewünschten Konzentration gelöst war, überschichtet. Das Deckgläschen wurde so zunächst für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert, ehe es bei Raumtemperatur auf dem Objekttisch des Konfokalmikroskops (Leica TCS SP5) befestigt wurde.

Zur Aufnahme der Bilder wurde die Software LAS AF (Leica) verwendet. Laser, Objektiv, Lochblendendurchmesser, Strahlenteiler und Detektionsbereiche wurden wie in Kap. 3.3.4.3 beschrieben eingestellt. Die konfokalen Bilder wurden in einem Format von 2048 x 2048 Pixeln bei einer Geschwindigkeit von 400 Pixel/s (400 Hz) aufgenommen. Hierbei wurde für jeden Pixel einer Zeile der Mittelwert aus insgesamt drei Messungen ausgegeben (*Line Average* = 3). Die Emission der beiden zusammen verwendeten fluoreszierenden Proteine wurde jeweils simultan detektiert und die aufgenommenen Bilder als .lif-Dateien gespeichert. Auf jedem Deckgläschen konnten so beliebig viele Zellen aufgenommen werden.

Auswertung

Die zusammengehörenden Bilder einer Zelle wurden mit der Software ImageJ (National Institutes of Health, USA) geöffnet und wenn nötig zunächst Helligkeit und Kontrast verbessert. Anschließend wurden die Einzelfluoreszenzen der Aufnahme in einem *Merge*-Bild (engl. verschmelzen) kombiniert, sodass die Colokalisation der beiden fluoreszierenden Proteine besser beurteilt werden konnte. Alle Bilder wurden zuletzt als Tiff-Dateien gespeichert.

Zur Quantifizierung der Colokalisation wurde ImageJ mit dem Bildbearbeitungs-Plugin Fiji, das auch eine Erweiterung zur Beurteilung der Colokalisation enthält (*Colocalization Test*), verwendet. Hierfür wurde zunächst eine ROI um das Cytosol (ohne den Zellkern mit einzuschließen) von einzelnen Zellen gelegt (siehe Abb. 3.20) und anschließend durch die Software der Pearson-Korrelationskoeffizient für den markierten Bereich berechnet. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten wurden gesammelt und durch statistische Tests zwischen unterschiedlichen Bedingungen verglichen.

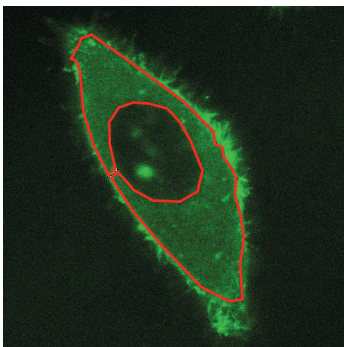


Abbildung 3.20 | Repräsentative konfokale Aufnahme mit ROI zur Auswertung der Colokalisation

3.3.5 | FRAP-Experimente

3.3.5.1 | Grundlagen der *Fluorescence Recovery After Photobleaching*

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) ist eine Methode der Fluoreszenzmikroskopie, mit der die Mobilität fluoreszenzmarkierter Moleküle in lebenden Zellen untersucht werden kann. Zuerst wurde FRAP im Jahr 1974 verwendet, um die Fluidität von Zellmembranen nach Markierung mit Fluorescein zu untersuchen (Peters *et al.*, 1974). Nach der Entdeckung der fluoreszierenden Proteine (Kap. 3.3.1.2) wurden die verschiedenen GFP-Varianten natürlich auch in FRAP-Experimenten eingesetzt. Die fluoreszierenden Proteine bieten den Vorteil, dass sie direkt an das zu untersuchende Protein fusioniert werden können, ohne dessen Lokalisation oder Funktion zu beeinflussen. Außerdem kann GFP durch die hohe Photostabilität über einen langen Zeitraum beobachtet werden (Neefjes und Reits, 2001). Bei der Durchführung eines FRAP-Experiments werden die Fluorophore in einem begrenzten Bereich der Zelle durch Bestrahlung mit Laserlicht hoher Intensität irreversibel geblichen. Anschließend wird die Wiederkehr der Fluoreszenz in die geblichene Region mit niedriger Laserintensität gemessen. Wenn die fluoreszenzmarkierten Moleküle immobil sind, nimmt die Fluoreszenzintensität im geblichenen Bereich nicht wieder zu. Können sich die fluoreszenzmarkierten Moleküle jedoch bewegen, z.B. durch Diffusion, können fluoreszierende Moleküle von außerhalb der geblichenen Region in diesen Bereich einwandern, wodurch die Fluoreszenzintensität dort ansteigt (Houtsmuller, 2005) (siehe Abb. 3.21). Mit Hilfe von FRAP lässt sich so die Fraktion derjenigen fluoreszenzmarkierten Proteine, die mobil bzw. immobil sind und die Geschwindigkeit, mit welcher sich die mobilen Proteine in den geblichenen Bereich bewegen, bestimmen.

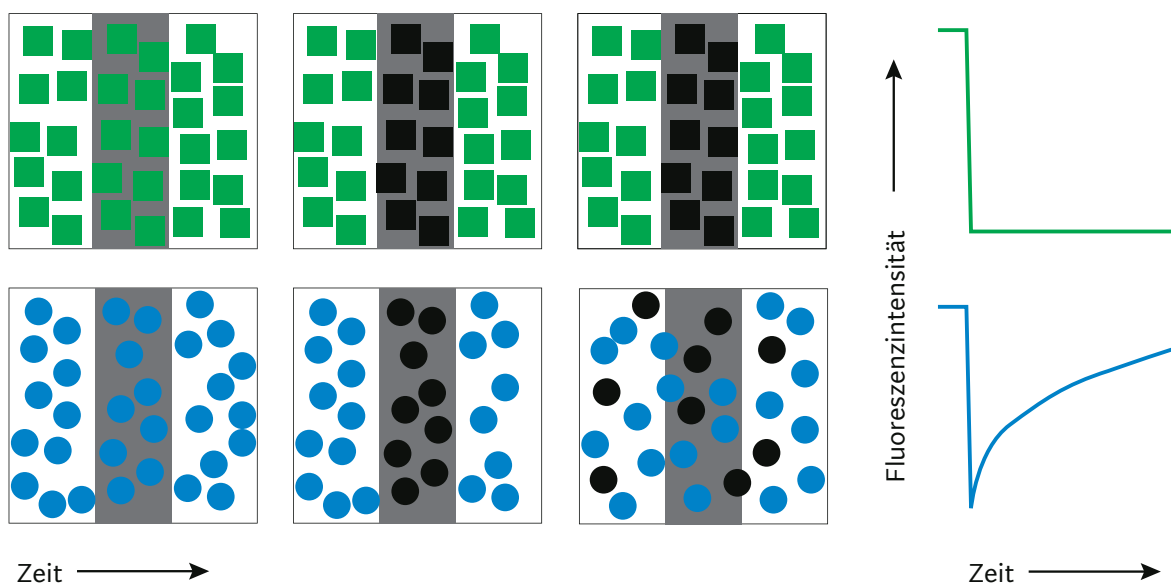


Abbildung 3.21 | Schematische Illustration des FRAP-Prinzips

Sind die geblichenen Fluorophore immobil, so bleibt die Fluoreszenzintensität anschließend unverändert auf niedrigem Level (grün). Können sich die Fluorophore jedoch bewegen, so steigt die Fluoreszenz im geblichenen Bereich anschließend wieder an (blau). (Abbildung verändert nach Houtsmuller, 2005.)

Seit der Einführung von Zweifarben-FRAP (Picard *et al.*, 2006) kann außerdem die Dynamik bzw. die Stärke von Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Hierbei werden zwei interagierende Proteine mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert und die laterale Mobilität des einen Proteins z.B. durch extrazelluläre Quervernetzung von Membranproteinen eingeschränkt. Wenn dadurch auch die Mobilität des zweiten Proteins reduziert wird, ist dies ein Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine (Digby *et al.*, 2006). Wenn eine stabile Interaktion zwischen den fluoreszenzmarkierten Proteinen stattfindet, so wird durch die Immobilisierung des ersten Proteins auch das zweite Protein unbeweglich und es findet keine Wiederkehr der Fluoreszenz des zweiten Proteins statt (siehe Abb. 3.22 rechts). Interagieren die beiden Proteine nicht miteinander, kommt es zu einer schnellen und vollständigen Wiederkehr des zweiten Proteins (siehe Abb. 3.22 links). Bei einer transienten Interaktion der beiden Proteine ist die Wiederkehr des zweiten Proteins durch die Quervernetzung des ersten Proteins deutlich verlangsamt (siehe Abb. 3.22 Mitte). Je stabiler hierbei die Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen ist, desto langsamer ist die Geschwindigkeit der Fluoreszenzwiederkehr des zweiten Proteins, da seine Mobilität durch die Bindung an das erste Protein eingeschränkt ist.

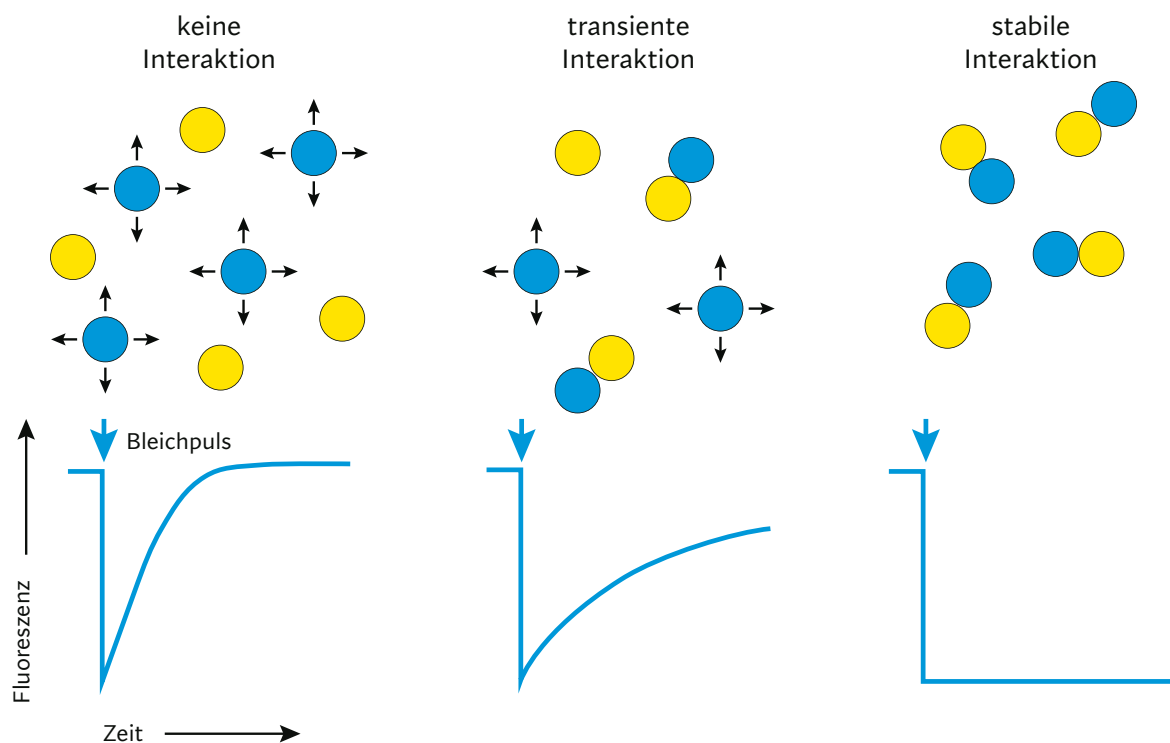


Abbildung 3.22 | Schematische Illustration der Messung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Zweifarben-FRAP

Fluoreszenzwiederkehr eines mobilen Proteins (blau) bei keiner, transienter oder stabiler Interaktion mit einem fixierten Protein (gelb). (Abbildung verändert nach Digby *et al.*, 2006.)

Auf diese Weise wurde beispielsweise die Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten (Digby *et al.*, 2006) oder die Dimerisierung von β -adrenergen Rezeptoren (Dorsch *et al.*, 2009) untersucht. Auch die Interaktionsstärke von Arrestin und GPCRs wurde bereits mittels Zweifarben-FRAP analysiert (Zindel *et al.*, 2015).

3.3.5.2 | Mikroskop und verwendete fluoreszierende Proteine

In dieser Arbeit wurde für FRAP-Experimente ein Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop genutzt (siehe Kap. 3.3.4.3 für eine genauere Beschreibung des Mikroskops). Zur Anregung von CFP-Varianten wurde ein Diodenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 405 nm und zur Anregung von YFP-Varianten ein Argonlaser mit 514 nm verwendet. Zur gleichzeitigen Beobachtung von CFP- und YFP-Fluoreszenz wurde ein RT70/30-Würfel als Strahlenteiler verwendet. Die Emission für CFP und die in dieser Arbeit meistens für FRAP verwendete Variante mTurquoise wurde im Bereich von 450–490 nm und für YFP bzw. dessen Varianten wurde die Emission bei 525–600 nm aufgenommen. Die Lochblende des Konfokalmikroskops wurde auf 1 *Airy Unit* (95,52 μm) eingestellt, um einen möglichst kleinen Bereich der Zellmembran zu untersuchen.

3.3.5.3 | Durchführung und Auswertung von FRAP-Messungen

Für FRAP-Messungen mit fluoreszierendem Arrestin-3 und verschiedenen Rezeptoren wurden transient transfizierte HEK293T-Zellen auf PLL-beschichtete Deckgläschen gesplittet. Zur Vorbereitung der Zellen wurde das Nährmedium von einem Deckgläschen in der 6-Well-Platte abgenommen und das Deckgläschen vorsichtig zweimal mit FRET-Puffer gewaschen. Zur Quervernetzung der extrazellulär mit YFP markierten Rezeptoren wurden die Zellen mit 1 ml Anti-GFP-Antikörper (#600-101-215, Rockland), der 1:100 in FRET-Puffer mit Zusatz von 2,5 % BSA gelöst war, für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung vorsichtig abgenommen und für bis zu vier weitere Deckgläschen wiederverwendet. Das mit dem Antikörper behandelte Deckgläschen wurde erneut dreimal mit FRET-Puffer gewaschen, in eine Attofluor-Messkammer eingespannt und mit dem entsprechenden Agonisten, der in der gewünschten Konzentration in FRET-Puffer gelöst war, überschichtet. Die Stimulation der Rezeptoren erfolgte für 15 min bei 37 °C, um eine robuste Rekrutierung des Arrestins zur Zellmembran zu erreichen. Anschließend wurde das Deckgläschen bei Raumtemperatur auf dem Objektisch des Konfokalmikroskops befestigt.

Bei der Durchführung der FRAP-Experimente wurde die Software LAS AF (Leica) mit FRAP Wizard genutzt. Für die Messung einer Zelle wurde hierbei folgendes Zeitprotokoll verwendet:

	Vor dem Bleichen	Bleichpuls	Nach dem Bleichen		
Anzahl der Bilder	5	1	5	15	4–10
zeitl. Abstand (s)	2	0,281	2	5	10

Jedes der aufgenommenen Bilder hatte hierbei eine Auflösung von 256 x 256 Pixel bei sechs-fachem Zoom und wurde mit einer Frequenz von 1000 Hz erstellt. Die Laserintensität für die Bilder vor und nach dem Bleichen wurde auf 20 % gestellt, während zum Bleichen selbst ausschließlich eine ROI von 3 x 2 μm der Zellmembran mit einer Intensität von 89 % beleuchtet wurde, um die Fluoreszenz in diesem Bereich auf ca. 20–40 % der Ausgangsintensität zu reduzieren. Auf jedem Deckgläschen konnten so bis zu 12 Zellen gemessen werden.

Auswertung

Die Messungen der einzelnen Zellen wurden im Dateiformat .lif gespeichert, sodass die Experimente später mit dem Programm LAS AF Lite (Leica) ausgewertet werden konnten. Mit Hilfe dieser Software wurde eine ROI um den geblichenen Bereich der Zellmembran sowie eine weitere ROI für die restliche Zellmembran definiert, mit welcher später das unerwünschte Photobleichen, das auch bei Bestrahlung der Fluorophore mit niedriger Laserintensität auftreten kann, korrigiert wurde (siehe Abb. 3.23). Für jede Einzelmessung wurden die Fluoreszenzintensitäten für jeden Messpunkt in beiden ROIs sowohl im CFP- als auch im YFP-Kanal in eine Excel-Datei exportiert, um die anschließenden Berechnungen durchzuführen.

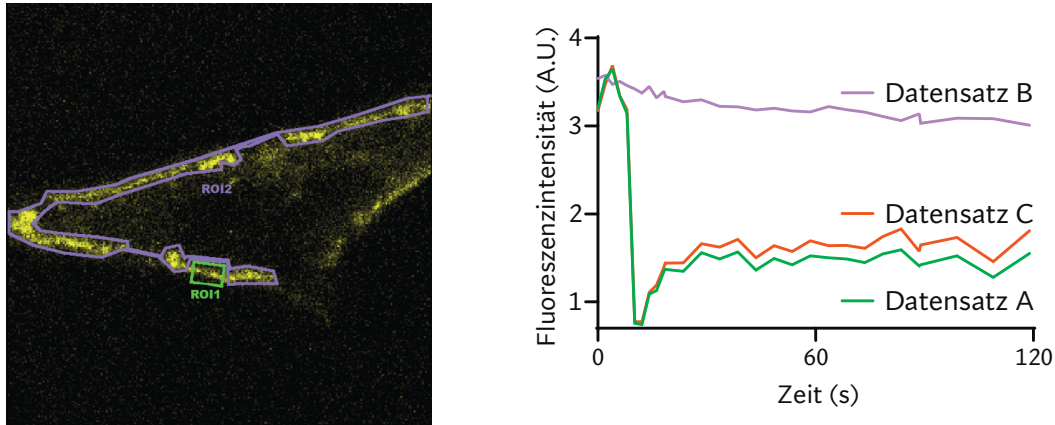


Abbildung 3.23 | Auswertung einer FRAP-Messung

Links: Gemessene Zelle mit ROIs um geblichenen Bereich (ROI1, grün) und die restliche Zellmembran (ROI2, violett).

Rechts: Messwerte für geblichenen Bereich (Datensatz A, grün) und ungeblichene Zellmembran (Datensatz B, violett) sowie um das Photobleichen korrigierte Werte der geblichenen ROI (Datensatz C, orange).

Die Fluoreszenzintensität der geblichenen ROI wurde als Graph gegen die Zeit dargestellt (Datensatz A). Zur Korrektur des Photobleichens wurde eine zweite ROI um die restliche, nicht geblichene Zellmembran gelegt (Datensatz B). Zur Ermittlung des zu jedem Messzeitpunkt geblichenen Anteils der Fluorophore wurden die fünf Messpunkte vor dem Bleichpuls von Datensatz B gemittelt (B_0) und als Referenzwert genommen, sodass der verbliebene Anteil der anfänglichen Fluoreszenzintensität berechnet werden konnte ($\frac{B}{B_0}$). Die Korrektur der Messwerte jedes einzelnen Zeitpunkts von Datensatz A erfolgte mit folgender Formel:

$$C = \frac{A}{\frac{B}{B_0}} = \frac{B_0}{B} * A$$

Zuletzt wurde die so erhaltene Kurve (Datensatz C) mit folgender Formel zwischen 0 und 1 normalisiert:

$$D = \frac{C - C_1}{C_0 - C_1} * 100 \%$$

Hierbei ist C_0 der Mittelwert aller Messpunkte des Datensatzes A vor dem Photobleichen (maximaler Wert) und C_1 der erste Datenpunkt von C nach dem Photobleichen (minimaler Wert).

Diese Berechnungen wurden bei jeder Zelle getrennt für die CFP- und YFP-Werte durchgeführt und die Graphen anschließend überprüft. Lag die Wiederkehr des YFP-markierten Rezeptors in einer Zelle über 50 %, so wurde diese Zelle für die Zusammenfassung der Ergebnisse ausgeschlossen. Auch wenn die CFP-Fluoreszenzintensität nach dem Bleichpuls starke Schwankungen aufwies, statt eine annähernd exponentielle Wiederkehr der Fluoreszenz aufzuzeigen, wurde die betroffene Zelle nicht weiter berücksichtigt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Messreihen mit gleichen Bedingungen zusammengefasst und die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten als Graph gegen die Zeit aufgetragen.

Für statistische Berechnungen wurde der Abschnitt des Graphen der CFP-Fluoreszenzintensität nach dem Bleichpuls gesondert betrachtet und für jede einzelne Messreihe eine monoexponentielle Kurve ermittelt, die der Fluoreszenzwiederkehr möglichst genau entsprach. Die Berechnungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.) anhand folgender Gleichung durchgeführt:

$$Y = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - \exp(-k * x))$$

„Plateau“ steht für den y-Wert bei $x = \infty$ und k für die Geschwindigkeitskonstante. Die erhaltenen k -Werte wurden gesammelt und durch statistische Tests zwischen unterschiedlichen Bedingungen verglichen.

3.4 | Protein-biochemische Methoden

3.4.1 | Expression von Proteinen in Rosetta-Zellen

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden Rosetta™2(DE3)-kompetente *E. coli* verwendet. Dieser Bakterienstamm wurde speziell für die Expression von eukaryotischen Proteinen entwickelt und enthält die genetischen Informationen für tRNAs für Codons, die in *E. coli* üblicherweise kaum verwendet werden, auf einem Plasmid mit Chloramphenicol-Resistenz. Die Sequenz für das zu exprimierende Protein muss hierzu in einem passenden Expressionsvektor vorliegen. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor basiert auf dem *E. coli*-Plasmid pTrcHisB, in das die Gensequenz von Arr3-FLAG so eingefügt wurde, dass das His-tag entfernt wurde. Die Expression des Zielproteins lässt sich durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), ein Analogon der Allolactose, induzieren.

Rosetta-kompetente *E. coli* wurden mit der Hitzeschock-Methode (Kap. 3.2.11) mit einem Expressionsvektor transformiert und auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte, auf der zusätzlich Chloramphenicol in einer Konzentration von ca. 30 µl/ml ausgestrichen worden war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einer auf der Platte gewachsenen Bakterienkolonie eine Vorkultur in 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37 °C inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag in 400 ml Ampicillin- und Chloramphenicol-haltiges LB-Medium überführt (Verdünnung der Bakterienkultur 1:200) und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm (OD_{600}) von 0,6–0,8 A.U. erreicht war, die *E. coli*-Zellen sich also in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Zu diesem Zeitpunkt wurde durch die Zugabe von 20 µM IPTG die Expression des gewünschten Proteins induziert und die Bakterien für weitere 16 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 5000 U/min geerntet und in 20 ml Lysepuffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 % Glycerol, 10 mM DTT, 1 Tablette Proteaseinhibitor cOmplete Mini, pH 8,5) resuspendiert. Danach wurden die Bakterien durch zehnminütige Sonifikation für 30 s pro Minute lysiert und das Lysat für 20 min bei 35.000 U/min zentrifugiert. Der resultierende Überstand, in dem sich das exprimierte Protein danach befand, wurde zuletzt aliquotiert und bei -80 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.4.2 | Vorbereitung von Protein-Proben

Zur Analyse von in HEK293T-Zellen exprimierten Proteinen wurden diese ca. 24 h nach der Transfektion geerntet. Hierzu wurden die auf 6 cm-Schalen gewachsenen Zellen zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 500 µl Lysepuffer (siehe Kap. 2.8.4) überschichtet. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und zusammen mit dem Puffer in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben für 30 s mit dem

Ultra-Turrax homogenisiert und unlösliche Zellbestandteile durch mindestens 30-minütige Zentrifugation bei 13.300 U/min und 4 °C pelletiert. Der Überstand, in dem sich die löslichen Proteine befanden, wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und entweder sofort weiterverwendet oder mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.3 | Proteinquantifizierung nach Bradford

Die absolute Proteinkonzentration einer Probe wurde photometrisch mittels Bradford-Assay ermittelt. Bei dieser Methode bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit unpolaren und kationischen Resten eines Proteins Komplexe, wodurch das Absorptionsspektrum des Farbstoffs von 470 nm zu 595 nm verschoben wird. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration, sodass diese durch die Bradford-Reaktion bestimmt werden kann.

Außerdem wurde die Absorption von BSA-Standardlösungen mit Konzentrationen von 50–2000 µg/ml ermittelt, sodass anhand einer Kalibriergeraden die Konzentrationen der Proben errechnet werden konnten. Da die Konzentrationen der Proben meist höher waren als die der Standardlösungen, wurden die Proben zur Durchführung des Bradford-Assays 1:5 mit Lysepuffer verdünnt. Für die Bradford-Reaktion wurden 5 µl jeder Probe bzw. Standardlösung in einer 96-Well-Platte mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt, 5 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert und mit dem Plattenlesegerät Tecan Spark anschließend die Absorption der Proben bei 595 nm gemessen. Aus den Ergebnissen wurden die Konzentrationen der Proteinproben berechnet und die gewünschte Menge an Protein anschließend für weitere Experimente verwendet.

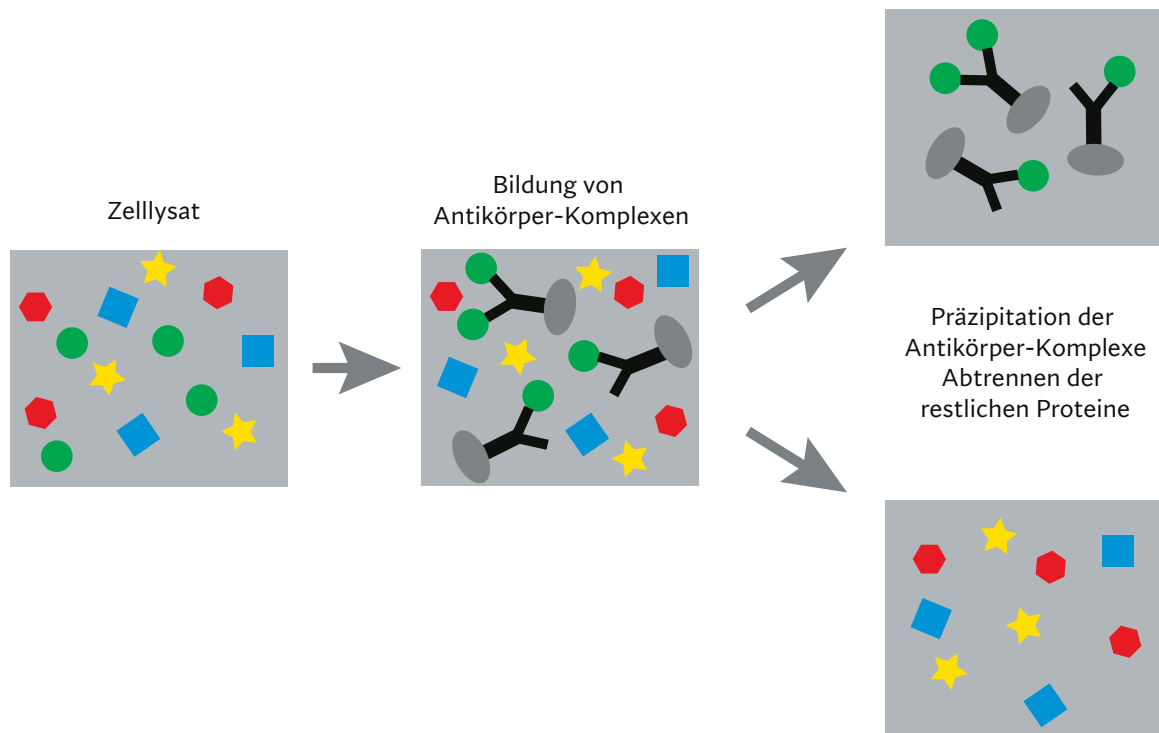


Abbildung 3.24 | Schematische Darstellung der Durchführung einer Immunopräzipitation

Zelllysat wird mit Agarose-gekoppelten Antikörpern versetzt, welche Proteine mit den passenden Antigenen (hier: grüne Kreise) binden. Die Immunokomplexe können anschließend präzipitiert und vom restlichen Zelllysat abgetrennt werden.

3.4.4 | Immunopräzipitation

Zur Analyse des Ubiquitinierungslevels der Arrestine wurden in dieser Arbeit Immunopräzipitationen von FLAG-markierten Arrestinen durchgeführt. Hierfür wurden für jede zu behandelte Probe 30 µl Anti-FLAG® M2-Affinitätsgel (Sigma Aldrich) dreimal mit 500 µl TBS gewaschen, anschließend mit den wie in Kap. 3.4.2 gewonnenen Proteinproben versetzt und für ca. 16 h bei 4 °C rotiert. In dieser Zeit konnte FLAG-markiertes Arrestin an die an der Agarose befestigten Antikörper binden (Abb. 3.24). Danach wurden die Agaroseperlen für 5 min bei 13.300 U/min und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet dreimal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen, sodass alle restlichen löslichen Zellbestandteile entfernt wurden (vgl. Abb. 3.24). Nach der letzten Zentrifugation wurde das Agarosepellet zunächst mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend mit 50 µl Lysepuffer verdünnt. 55 µl dieses Überstandes konnten schließlich auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden (siehe Kap. 3.4.6).

3.4.5 | Analyse der Proteininstabilität mit Cycloheximid

Zur Untersuchung der Proteininstabilität wurde Cycloheximid (CHX) verwendet, was als Translationshemmer die weitere Synthese neuer Proteine hemmt, sodass beobachtet werden konnte, wie die zum Zeitpunkt der CHX-Behandlung in der Zelle vorhandenen Proteine nach und nach abgebaut wurden.

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll basiert auf der Publikation von Kao *et al.* (2015). Auf 6 cm-Schalen gewachsene HEK293T-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit 300 µg/ml Cycloheximid oder 0,05 % DMSO in frischem Nährmedium überschichtet und für 8–47 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Zeitspanne wurden die Zellen analog zu Kap. 3.4.2 geerntet und die Proben vorbereitet. Mittels Bradford-Assay (siehe Kap. 3.4.3) wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt und von jeder Probe 40 µg Protein mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die weitere Vorgehensweise entsprach den Kapiteln 3.4.6 – 3.4.8.

3.4.6 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine 1970 entwickelte Variante der diskontinuierlichen Elektrophorese (Lämmli, 1970), die sich besonders gut dafür eignet, Proteine mit Molekülmassen zwischen 5 und 250 kDa der Größe nach in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Hierfür wird das Probenmaterial mit dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, was zur Denaturierung der Proteine führt. Außerdem wird durch Anlagern von SDS an die Oberfläche von Proteinen nicht nur deren Eigenladung verdeckt, sondern jedes Protein proportional zur Masse mit einer negativen Ladung versehen. Durch die zusätzliche Verwendung von Reduktionsmitteln wie β -Mercaptoethanol werden zudem Disulfidbrücken gespalten, sodass die Proteine nahezu vollständig entfaltet werden. Als Trennmedium dient ein zweigeteiltes Gel auf Polyacrylamidbasis. Da in den beiden Gelteilen außerdem unterschiedliche pH-Werte herrschen, findet an der Grenze ein Stapelungseffekt statt, wodurch die Banden der einzelnen Proteine schmaler und schärfer werden. Sobald die Protein-SDS-Komplexe in das unter dem Sammelgel befindliche Trenngel übergetreten sind, werden sie anhand ihrer Ladung bzw. Molekülmasse aufgetrennt (vgl. Abb. 3.25).

In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus 12%-igem Polyacrylamid-Trenngel mit einem 3,5%-igem Sammelgel verwendet, das mit Hilfe eines Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Moduls (Bio-Rad) gegossen wurde. Das polymerisierte Gel wurde in eine Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresekammer (Bio-Rad) eingespannt und mit Laufpuffer (vgl. Kap. 2.8.4) aufgefüllt. Die auf-

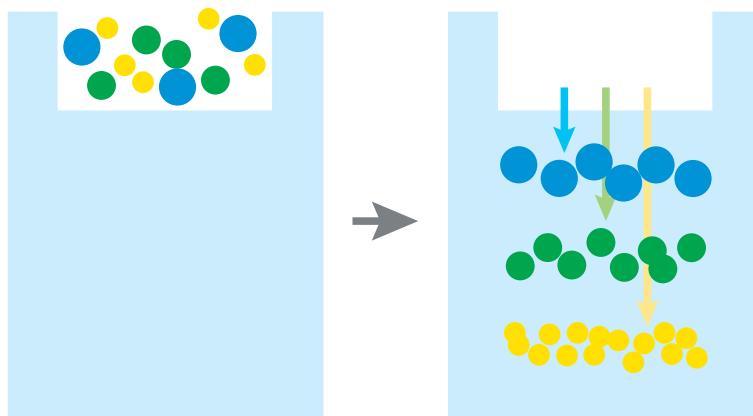


Abbildung 3.25 | Schematische Darstellung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

zutragenden Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer gemischt und zusammen mit einem Proteinmarker (peqGold Protein Marker V, VWR), der dabei half, die Größe der Proteinbanden abzuschätzen, auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 60 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchquert hatten, was anhand des blauen Farbstoffs im SDS-Probenpuffer abgeschätzt werden konnte. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese für bis zu weitere 2 h durchgeführt, bis der blaue Farbstoff das gesamte Polyacrylamid-Gel durchquert hatte.

3.4.7 | Western Blot

Als Western Blot wird die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet, wo sie schlussendlich mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden können. Nach Auftrennung der Proteine auf einem Polyacrylamidgel (siehe Kap 3.4.6) wurden diese durch Anlegen eines Spannungsfeldes auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) überführt. Für den Proteintransfer wurde in dieser Arbeit das sogenannte Wet-Blot-Verfahren angewendet, das auf der *Tank Blot*-Methode von Towbin *et al.* (1979) beruht. Die Proteine folgen hierbei dem senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feld und bleiben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der PVDF-Membran haften.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel der Gelelektrophoresekammer entnommen und mit Hilfe des Mini Trans-Blot® Systems (Bio-Rad) ein „Sandwich“ aus Polyacrylamid-Gel, PVDF-Membran, Schwämmen und Filterpapier aufgebaut. Die PVDF-Membran wurde zuvor für ca. 10 min in Methanol eingelegt, um die Hydrophobizität der Membran zu vermindern und die Benetzung mit Transferpuffer zu ermöglichen. Der Western-Blot-Sandwich (siehe Abb. 3.26) wurde in der Mini Trans-Blot® Kammer (Bio-Rad) befestigt, die vollständig mit Transferpuffer (vgl. Kap. 2.8.4) gefüllt wurde. Anschließend wurde bei 4 °C für 150 min ein elektrischer Strom von 325 mA angelegt. Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran entnom-

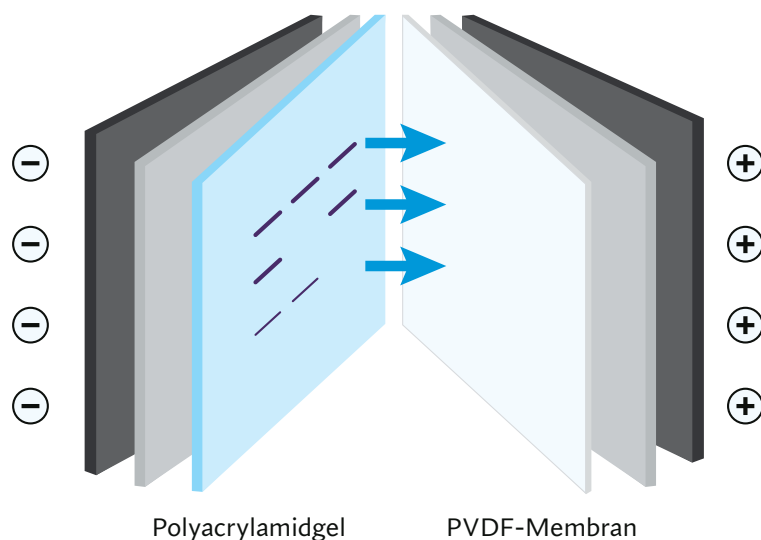


Abbildung 3.26 | Schematischer Aufbau eines Western Blots

Polyacrylamidgel und PVDF-Membran werden aufeinandergelegt und auf beiden Seiten mit Whatman-Filterpapier (hellgrau) und Schwämmen (dunkelgrau) bedeckt. Die Proteine auf dem Polyacrylamidgel folgen dem elektrischen Feld und bleiben an der PVDF-Membran haften.

men und für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBST unter Schütteln inkubiert, um ein unspezifisches Binden der Antikörper an die hydrophobe Membran zu verhindern.

3.4.8 | Immunochemische Detektion

Die Banden der zu untersuchenden Proteine wurden auf der PVDF-Membran durch die Verwendung spezifischer Antikörper sichtbar gemacht, die an einzelne Epitope des Zielproteins binden konnten (vgl. Abb. 3.27). Die proteinbeladene PVDF-Membran wurde hierzu zunächst in eine verdünnte Primärantikörper-Lösung in 5 % Milchpulver in TBST gelegt, wobei der Antikörper direkt an eine Struktur des Zielproteins binden konnte. Die Inkubation erfolgte meist für etwa 16 h (über Nacht) bei 4 °C auf einer Wippe. Anschließend wurde der Blot für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor die Antikörperlösung abgenommen und der Blot dreimal für 15 min mit TBST gewaschen wurde, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit einer verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers in 5 % Milchpulver in TBST unter ständigem Schütteln inkubiert. Dieser konnte an die Fc-Region des zuvor verwendeten Primärantikörpers binden und war zudem mit einer Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal für 15 min mit TBST gewaschen. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die PVDF-Membran zuletzt für 5 min in Luminol-basierter ECL-Lösung (*Enhanced Chemiluminescence*) unter Lichtausschluss inkubiert. Durch die Peroxidase wird Luminol in seine oxidierte Form überführt, wobei Licht freigesetzt wird, welches im ChemiDoc XRS mit der Software Quantity One (beides Bio-Rad) detektiert wurde.

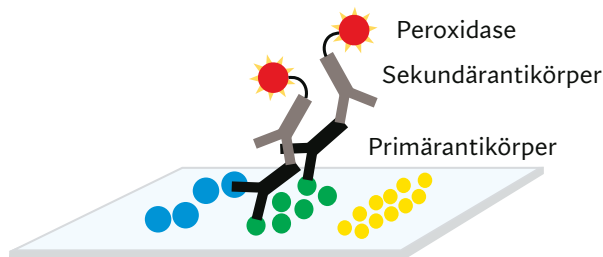


Abbildung 3.27 | Schematische Darstellung der Immunodetektion membrangebundener Proteine

Zur Quantifizierung der detektierten Proteinmenge wurde das Programm ImageLab (Bio-Rad) verwendet. Dabei wurden mit dem *Volume Tool* gleich große rechteckige ROIs um die auszuwertenden Banden gezeichnet. Eine weitere identische ROI wurde zur Ermittlung des Hintergrundsignals verwendet, das anschließend von den Werten der anderen ROIs subtrahiert wurde. Um die Vergleichbarkeiten der Signalintensitäten zu gewährleisten, wurde für jeden Western Blot auch eine Ladungskontrolle durchgeführt. Hierfür wurde entweder die auf das Gel aufgetragene Menge eines Proteins, das eine hohe konstitutive Expression in HEK293T-Zellen hat (z.B. Aktin), analysiert. Im Fall von Immunopräzipitationen wurde die Menge des präzipitierten Proteins mit einem Antikörper gegen das gleiche Epitop, mit dem auch die Immunopräzipitation selbst durchgeführt

worden war (z.B. FLAG-Markierung), überprüft. Um auf einer PVDF-Membran ein zweites Protein zu untersuchen, musste die Membran zuerst gestrippt werden (siehe Kap. 3.4.9), bevor ein neuer Primärantikörper auf den Blot gegeben werden konnte.

3.4.9 | Strippen von PVDF-Membranen

Um eine PVDF-Membran erneut mit Antikörpern gegen weitere Proteine inkubieren zu können, mussten zunächst die bereits an ein Antigen auf der Membran gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde der Blot zweimal für 20 min mit einer sauren Pufferlösung (Stripping-Puffer, siehe Kap. 2.8.4) inkubiert, wodurch die Antikörper denaturiert wurden, sodass sie ihre Fähigkeit, an andere Proteine zu binden, verloren. Anschließend wurde der pH-Wert durch wiederholtes Waschen mit verschiedenen Puffern wieder neutralisiert. Zuerst wurde die Membran zweimal für 15 min mit PBS unter Schütteln inkubiert, dann folgten erneut zwei 15-minütige Waschschrte mit TBST. Um auch hier sicherzustellen, dass keine Antikörper unspezifisch an die PVDF-Membran binden konnten, wurde der Blot nochmals für etwa 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in TBST inkubiert, bevor der nächste Primärantikörper auf die Membran gegeben wurde.

3.5 | Statistik

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurden die Daten von zwei oder drei unabhängigen Experimenten (unabhängigen Transfektionen) herangezogen. Die jeweils angegebene Zahl n bezeichnet hierbei die Anzahl der Einzelexperimente wie z.B. die Anzahl untersuchter Zellen oder Wells. Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler (*Standard error of the mean*, SEM).

Alle Berechnungen zur Statistik wurden mit der Software GraphPad Prism 8.3 durchgeführt. Um das Signifikanzniveau von zwei Messreihen zu vergleichen, wurden einseitige t-Tests verwendet. Sollten mehr als zwei Messreihen verglichen werden, wurden einfache ANOVA-Tests (*Analysis of variance*) mit anschließenden Post-Hoc-Tests, die individuell für jedes Experiment definiert wurden, durchgeführt. Unterschiede zwischen Messreihen wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ war.

Kapitel 4 | Ergebnisse

Wie in Kap. 1.2.2 erwähnt, werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren anhand ihres Internalisierungsverhaltens mit Arrestin in zwei Klassen aufgeteilt. Klasse-A-Rezeptoren, wie z.B. der β_2 AR, interagieren nur transient mit Arrestin, sodass sie ohne Arrestin in Endosomen aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu bildet Arrestin mit Klasse-B-Rezeptoren, wie dem Angiotensin-1-Rezeptor (AT_1R), stabile Komplexe und co-internalisiert mit dem GPCR ins Zellinnere. Im Folgenden wurde untersucht, wie posttranslationale Modifikationen wie z.B. die Ubiquitinierung von Arrestin oder spezifische Agonisten die Internalisierung von Arrestin-3 beeinflussen.

4.1 | Untersuchung der Ubiquitinierung von Arrestin-3

4.1.1 | Bedeutung der Lysine 11 und 12 als Ubiquitinierungsstellen

Bisher wurde angenommen, dass die Ubiquitinierung der Lysinreste 11 und 12 von Arrestin-3 eine wichtige Rolle für die Co-Internalisierung mit dem AT_1R spielt (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Werden diese Lysine unter Beibehaltung der positiven Ladung durch Arginine ersetzt (Arr3 KK11RR), internalisiert diese Mutante nicht mehr zusammen mit dem AT_1R . Im Gegensatz dazu ist die Internalisierung mit zwei anderen Klasse-B-Rezeptoren, dem Vasopressin-2-Rezeptor (V_2R) und Neurokinin-1-Rezeptor (NK1R), nicht beeinträchtigt, wenn diese Ubiquitinierungsstellen entfernt werden.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass die Arrestin-Mutante auch mit anderen Rezeptoren als dem AT_1R (β_2 AR-SSS, β_2V_2R , PTHR) nur noch transient interagiert (Zindel, 2015). Eine neue Hypothese zur Erklärung dieses Verhaltens (außer der Ubiquitinierung) wurde aufgrund einer Docking-Analyse in Kollaboration mit Prof. Peter Hildebrand (Universität Leipzig/Charité Berlin) aufgestellt. Demnach verstärkt die KK11RR-Mutation in Arrestin-3 die intramolekularen Wechselwirkungen mit dem eigenen C-Terminus. Dieser blockiert in der basalen Konformation die N-Domäne des Arrestins und löst sich bei dessen Aktivierung, damit dort der phosphorylierte C-Terminus des GPCRs binden kann. Daher wurde vermutet, dass die KK11RR-Mutation die inaktive Arrestin-Konformation stabilisiert, was dazu führt, dass Arr3 KK11RR nur noch transient an Rezeptoren bindet, weil es nach der Rezeptorinteraktion schneller in den inaktiven Zustand zurückkehrt als das Wildtyp-Arrestin.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden weitere Mutationen in Arr3 KK11RR eingefügt, die die Freigabe des autoinhibitorischen C-Terminus und damit die erschwerte Aktivierung von Arr3 KK11RR wieder umkehren sollten. Hierfür wurde zum einen die aktivierende Mutation R170E ausgewählt, die die ionischen Wechselwirkungen des zentralen polaren Kerns (*polar core*) von Arrestin-3 zerstört und dadurch sogar dessen Bindung an unphosphorylierte Rezeptoren ermöglicht (Kovoor *et al.*, 1999, Cerver *et al.*, 2002). Außerdem wurden in den Docking-Untersuchungen die Aminosäuren E389 und D390 im C-Terminus von Arrestin-3 als Hauptinteraktions-

partner der Arginine in Arr3 KK11RR identifiziert, die daher in einem weiteren Ansatz zu Alaninen mutiert wurden, um die intramolekularen Wechselwirkungen mit den Argininen zu zerstören (ED389AA).

Als Erstes wurde experimentell überprüft, ob sich die Stabilität von Rezeptor-Arr3 KK11RR-Komplexen in FRAP-Experimenten durch das zusätzliche Einfügen der beiden beschriebenen Mutationen (R170E und ED389AA) wieder erhöht. Bei diesen Experimenten führen schwächere Interaktionen von aktivierten Rezeptoren mit Arrestin zur schnelleren Dissoziation der Komplexe, was einen rascheren Austausch der geblichenen Proteine mit fluoreszierenden Arrestinen ermöglicht. Auf diese Weise kann durch das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Wiederkehr der Arrestin-Fluoreszenz die Stabilität von Arrestin-Rezeptor-Komplexen beurteilt werden.

Wie in Abb. 4.1 A dargestellt ist, war die Wiederkehr der Fluoreszenz von Arr3 KK11RR mit ca. 60% (bezogen auf die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen) deutlich höher als von Arr3 WT mit nur etwa 35%, was auf eine deutlich schnellere Dissoziation von Arr3 KK11RR vom β_2V_2R

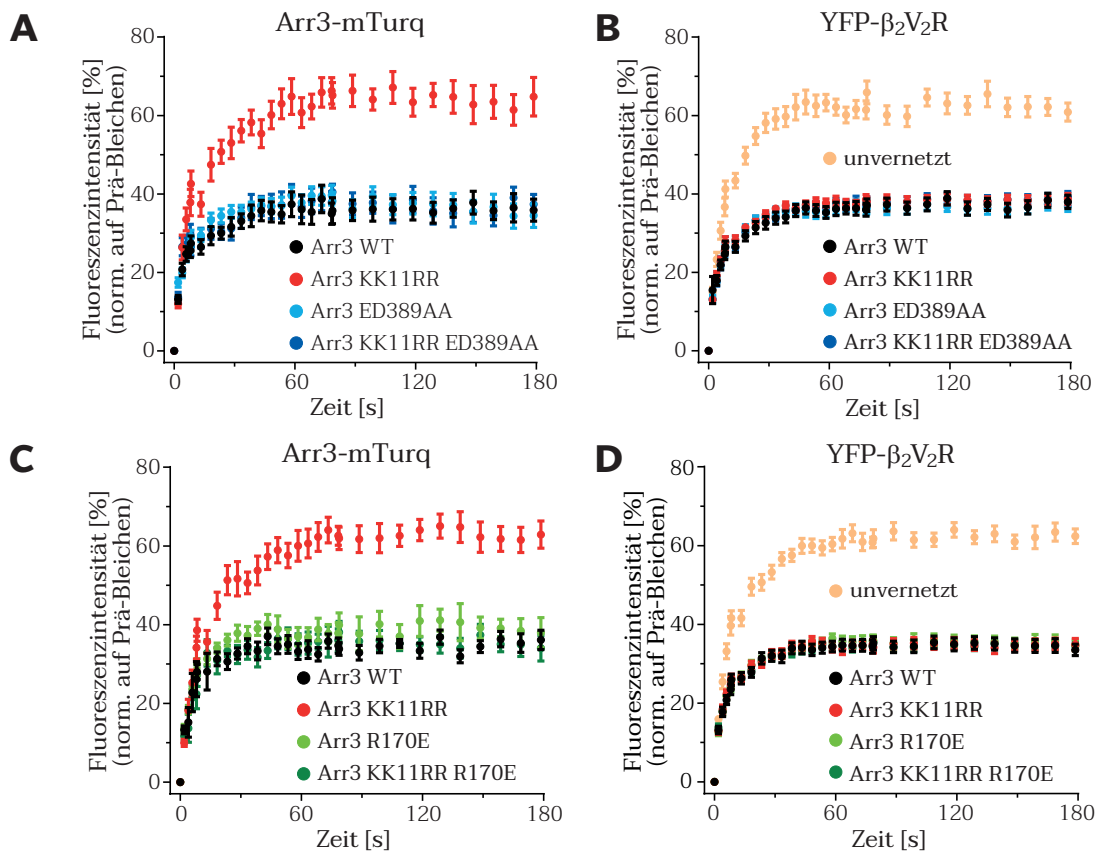


Abbildung 4.1 | Bestimmung der Affinität verschiedener Arr3-Mutanten zum β_2V_2R mittels FRAP

Die FRAP-Messungen wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.5.3 beschrieben. Die Rezeptoren wurden für 15 min bei 37°C bzw. Raumtemperatur (unternetzte Rezeptoren) mit 10 μ M Isoprenalin stimuliert und anschließend die Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen simultan für mTurq-markiertes Arr3 und YFP-markierte Rezeptoren aufgenommen. Die Werte wurden auf die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen (100%) und nach dem Bleichen (0%) normalisiert. **A:** Wiederkehr der auf der Mutation ED389AA basierenden Arrestin-3-Varianten. **B:** Wiederkehr des β_2V_2R in den Experimenten von A. **C:** Wiederkehr der auf der Mutation R170E basierenden Arrestin-3-Varianten. **D:** Wiederkehr des β_2V_2R in den Experimenten von C. (A/B: WT: n = 33; KK11RR: n = 31; ED389AA: n = 32; KK11RR ED389AA: n = 32; unternetzt: n = 24; C/D: WT: n = 35; KK11RR: n = 38; R170E: n = 40; KK11RR R170E: n = 40; unternetzt: n = 22 von drei unabhängigen Messtagen)

hinweist. Im Gegensatz dazu kehrten sowohl Arr3 ED389AA als auch Arr3 KK11RR ED389AA wieder im gleichen Ausmaß wie Arr3 WT zurück. Beim Vergleich der Fluoreszenzwiederkehr der Arrestin-Mutanten (Abb. 4.1 A) mit den Rezeptoren (Abb. 4.1 B) fällt auf, dass bei Arr3 WT, Arr3 ED389AA und Arr3 KK11RR ED389AA die mTurquoise-markierten Arrestine und YFP-markierten Rezeptoren mit ähnlicher Kinetik und zu fast identischer Intensität zurückkehrten. Daher beruhte die Wiederkehr der Arrestine in diesen Experimenten wahrscheinlich hauptsächlich auf der Diffusion stabiler Arrestin-Rezeptor-Komplexe, statt auf dem Austausch geblichener und leuchtender Arrestine am Rezeptor.

Ebenso konnte der zusätzliche Einbau der aktivierenden Mutation R170E die reduzierte Affinität von Arr3 KK11RR wieder erhöhen, sodass die Fluoreszenz der Arr3-Mutante KK11RR R170E genauso schnell und stark zurückkehrte wie Arr3 WT (Abb. 4.1 C). Der Anstieg der Arrestin-Fluoreszenz für Arr3 WT, Arr3 R170E und Arr3 KK11RR R170E resultierte hier vermutlich ebenfalls aus der Diffusion von stabilen Arrestin-Rezeptor-Komplexen (vgl. Abb. 4.1 D).

In den FRAP-Messungen zeigten also sowohl Arr3 KK11RR R170E als auch Arr3 KK11RR ED389AA ähnliche Mobilitäten wie Arr3 WT. Die Stabilität der Komplexe von Arr3 KK11RR mit dem β_2V_2R wurde also sowohl durch das Einfügen der aktivierenden Mutation R170E als auch durch die Mutation ED389AA, welche die intramolekularen Wechselwirkungen mit den Argininen zerstört, wieder auf das Wildtyp-Niveau zurückgebracht.

Im Folgenden stellte sich daher die Frage, ob auch die beeinträchtigte Internalisierung von Arr3 KK11RR mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren durch die zusätzlichen Mutationen wiederhergestellt werden kann. Dafür wurden mehrere Rezeptoren ausgewählt und für 30 min bei 37°C mit einem Agonisten stimuliert, bevor mit einem Konfokalmikroskop die Lokalisation der GFP-markierten Arrestin-Varianten und mCherry-markierten Rezeptoren untersucht wurde.

Wie bereits von Diana Zindel beschrieben wurde (Zindel, 2015), zeigte Arr3 KK11RR mit dem PTHR, dem β_2AR -SSS und dem β_2V_2R eine reduzierte Colokalisation in Endosomen (siehe Abb. 4.2). Durch das zusätzlichen Einfügen der Mutationen ED389AA oder R170E konnte die beeinträchtigte Internalisierung von Arr3 KK11RR jedoch mit allen drei Rezeptoren wiederhergestellt werden. Wurden diese Aminosäuren ohne die Lysin-zu-Arginin-Mutation in Arrestin-3 ausgetauscht (Arr3 ED389AA, Arr3 R170E), so wurden diese ebenfalls unverändert in Endosomen aufgenommen (Abb. 4.2 A, B, C).

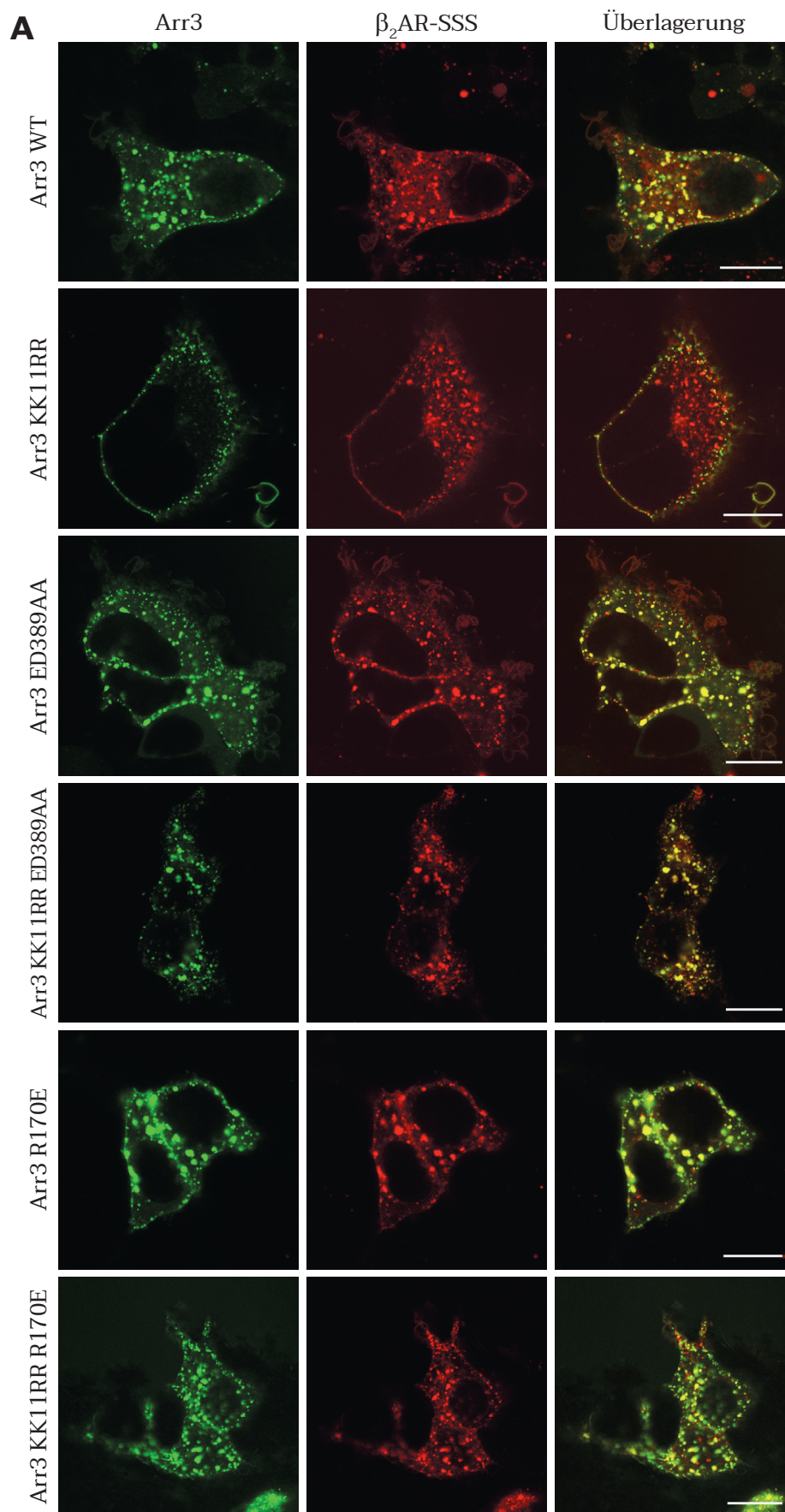


Abbildung 4.2 | Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

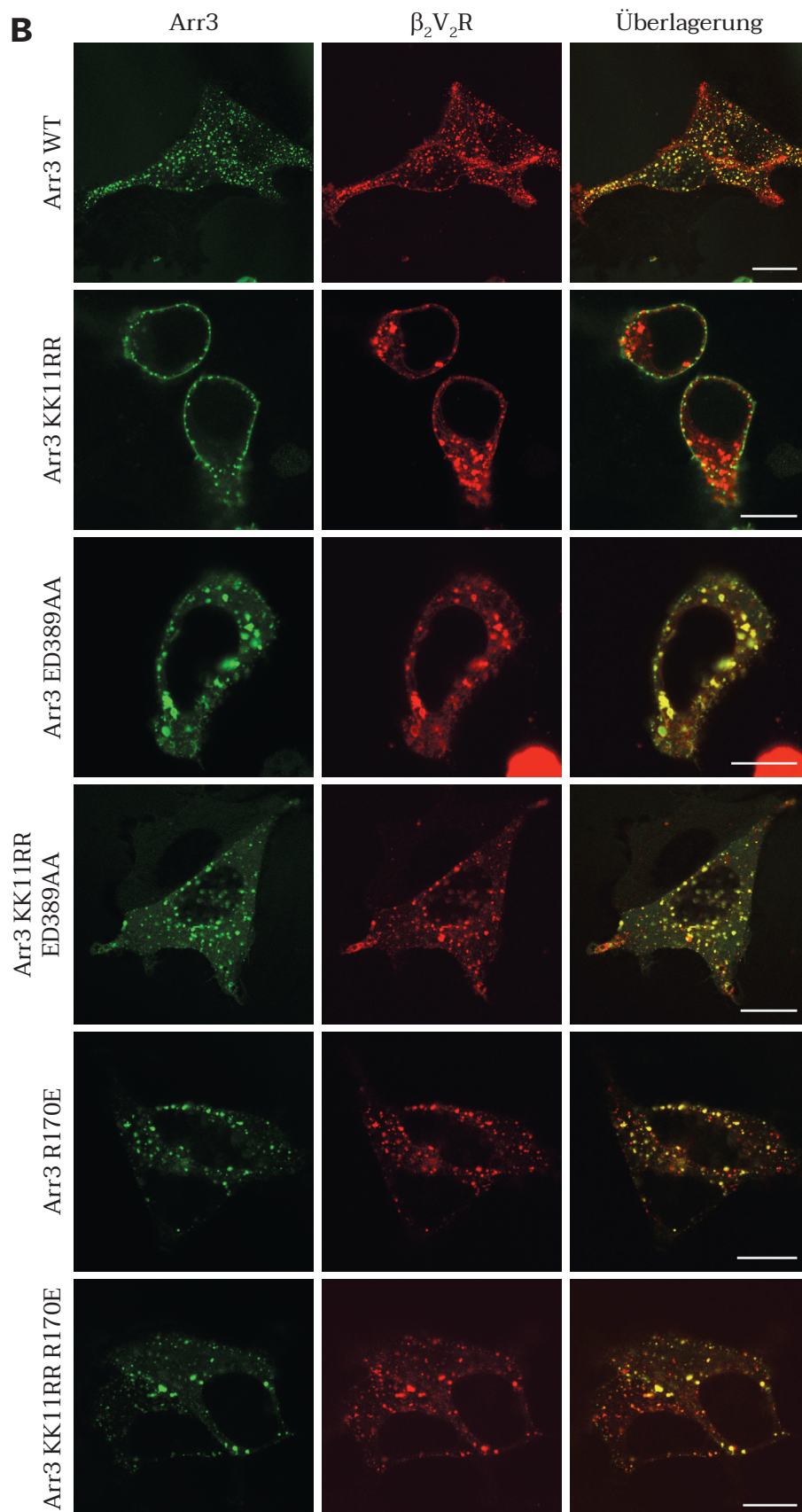


Abbildung 4.2 | Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Transient mit Arr3-GFP, mCherry-markierten Rezeptoren und GRK2 transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit Agonist stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

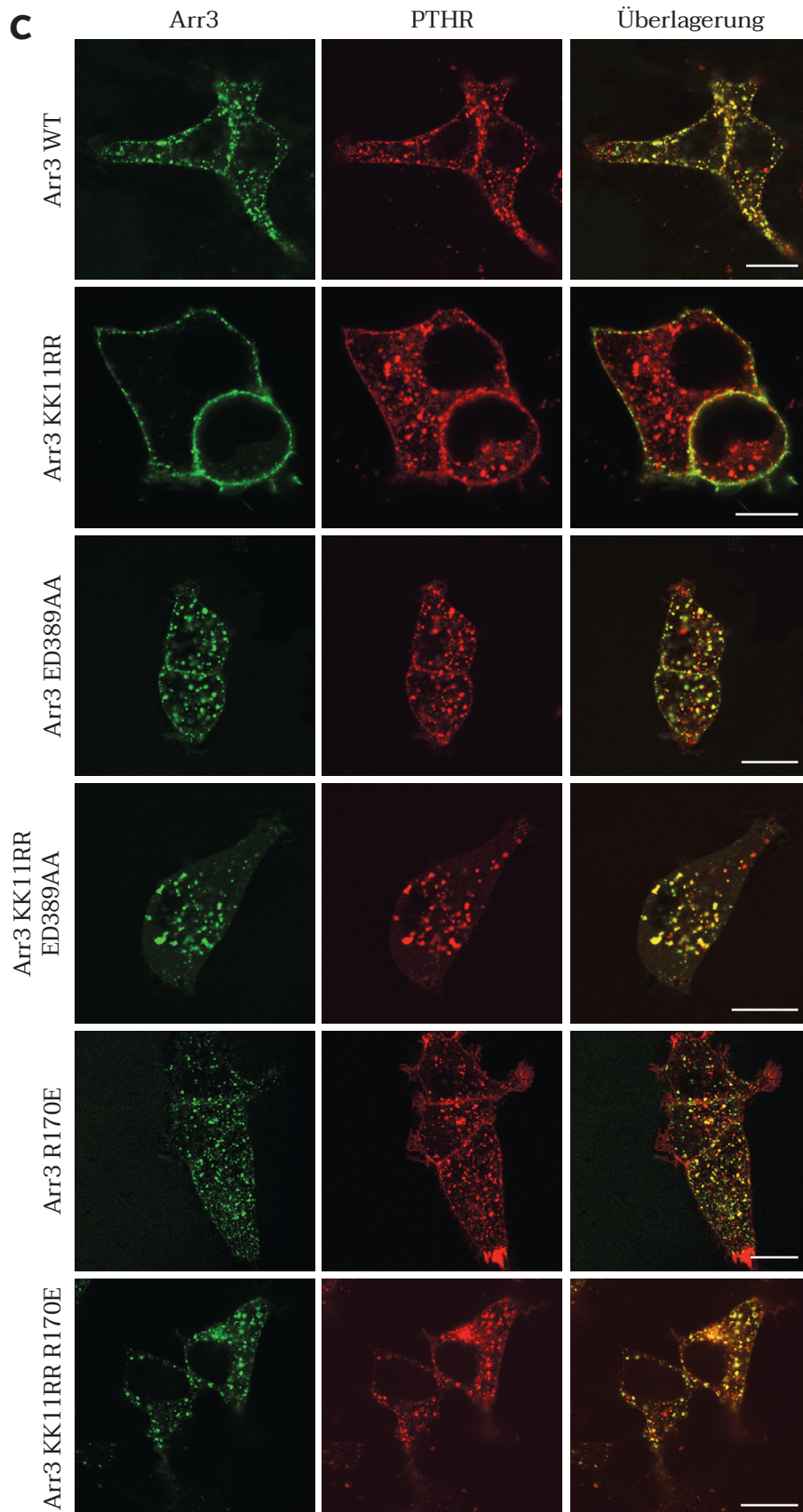


Abbildung 4.2 | Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Visualisierung der Lokalisation der Arrestin-3-Mutanten mit dem β_2 AR-SSS (A) oder dem β_2 V₂R (B) nach Stimulation der Zellen mit 10 μ M Isoprenalin oder dem PTHR (C) nach Stimulation der Zellen mit 1 μ M PTH 1-34.

Die Quantifizierung der Colokalisation von Arrestin-3 mit den Rezeptoren in den konfokalen Bildern ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Arrestin und Arr3 KK11RR ED389AA bzw. Arr3 KK11RR R170E (siehe Abb. 4.3 A, B, C). Dies bestätigt, dass diese Mutanten sowie Arr3 ED389AA und Arr3 R170E im gleichen Ausmaß zusammen mit den Rezeptoren in Endosomen transportiert wurden wie Arr3 WT. Im Gegensatz dazu war die endosomale Colokalisation von Arr3 KK11RR mit allen Rezeptoren deutlich verringert.

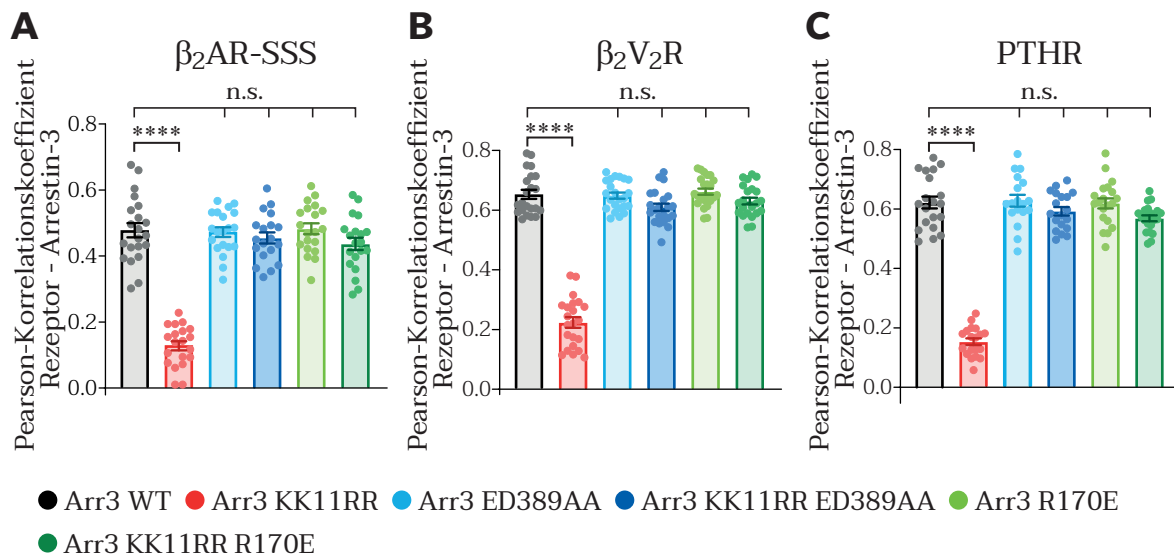


Abbildung 4.3 | Quantifizierung der Colokalisation zwischen Rezeptoren und Arrestin-3

Die Colokalisation von Rezeptoren und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Quantifizierung der Colokalisation zwischen Arrestin-3 und dem β_2 AR-SSS (**A**), β_2 V₂R (**B**) und dem PTHR (**C**). (A: Arr3 WT: n = 21; Arr3 KK11RR: n = 20; Arr3 ED389AA: n = 20; Arr3 KK11RR ED389AA: n = 19; Arr3 R170E: n = 20; Arr3 KK11RR R170E: n = 20; B: Arr3 WT: n = 22; Arr3 KK11RR: n = 22; Arr3 ED389AA: n = 23; Arr3 KK11RR ED389AA: n = 22; Arr3 R170E: n = 23; Arr3 KK11RR R170E: n = 22; C: Arr3 WT: n = 20; Arr3 KK11RR: n = 19; Arr3 ED389AA: n = 18; Arr3 KK11RR ED389AA: n = 19; Arr3 R170E: n = 20; Arr3 KK11RR R170E: n = 21 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurden einfache ANOVA-Tests gefolgt von Tukey-Posttests durchgeführt (****p < 0,0001, ns p ≥ 0,05).

Zusätzlich sollte in dieser Arbeit die Co-Internalisierung der Mutante Arr3 KK11RR ED389AA mit den Rezeptoren AT₁R und V₂R untersucht werden. Da die Expression fluoreszierender Varianten des AT₁R jedoch Probleme bereitete, wurden beide Rezeptoren ohne Fluoreszenzmarkierung verwendet und stattdessen mithilfe des endosomalen Markers EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) die Lokalisation der fluoreszierenden Arrestine in Endosomen überprüft.

Mit dem AT₁R zeigte sich ebenfalls eine Umkehr der reduzierten Internalisierung von Arr3 KK11RR durch das zusätzliche Einfügen der Mutation ED389AA, die die Interaktion zwischen den Arginin-Resten und dem Arrestin-C-Terminus des Arrestins unterbindet (Abb. 4.4 A). Die Colokalisation von Arr3 KK11RR ED389AA mit EEA1 lag somit auf gleichem Niveau wie Arr3 WT (Abb. 4.4 B).

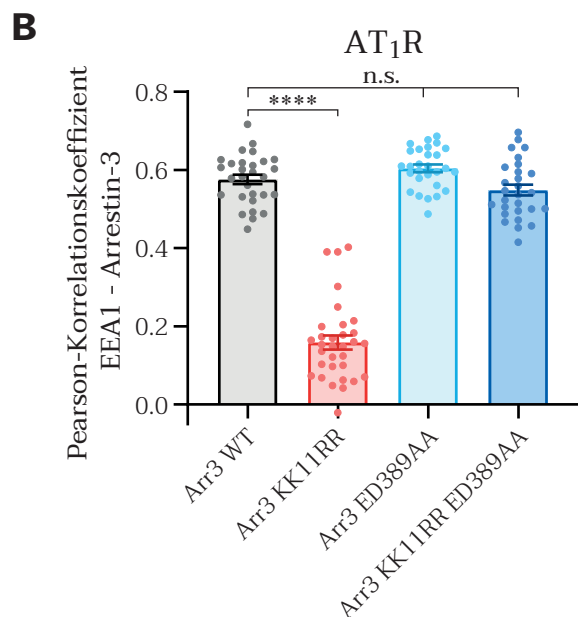
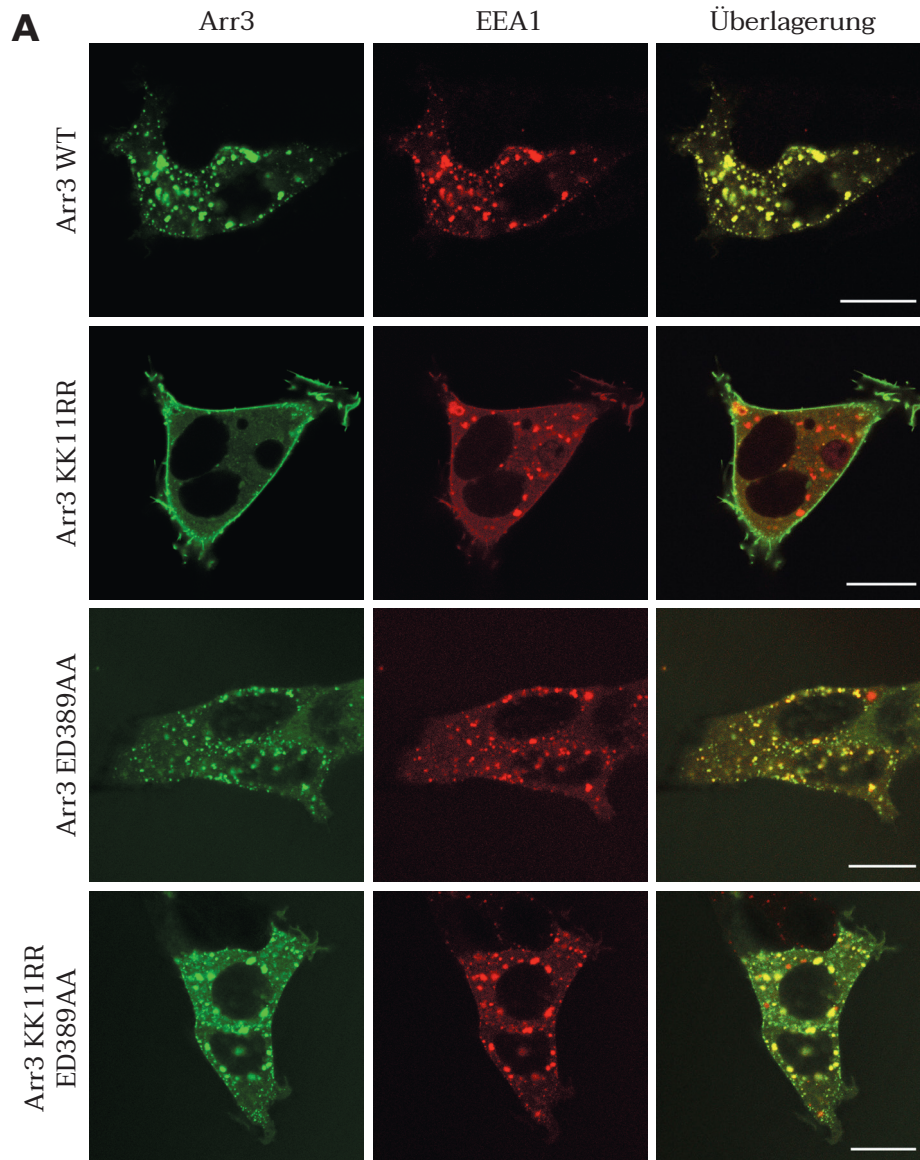


Abbildung 4.4 | Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation des AT₁R

A Transient mit AT₁R, GRK2, Arr3-GFP und mCherry-EEA1 transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 µM Angiotensin II (AT II) stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 µm.

B Die Colokalisation von EEA1 und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Arr3 WT: n = 29; Arr3 KK11RR: n = 32; Arr3 ED389AA: n = 28; Arr3 KK11RR ED389AA: n = 28 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****p < 0,0001, ns p ≥ 0,05).

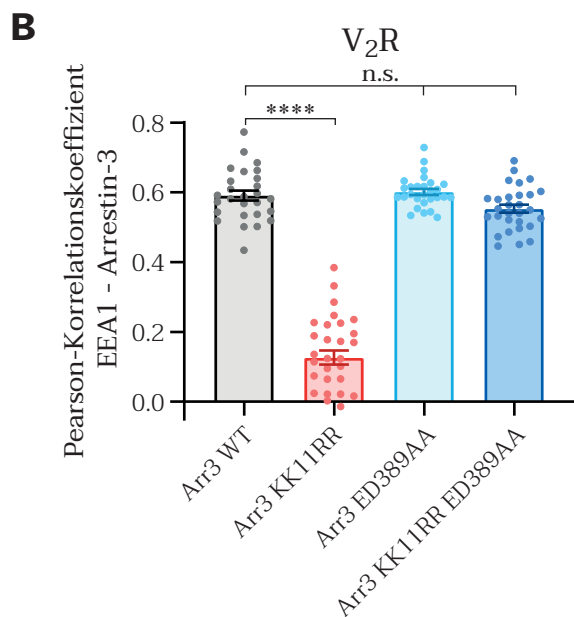
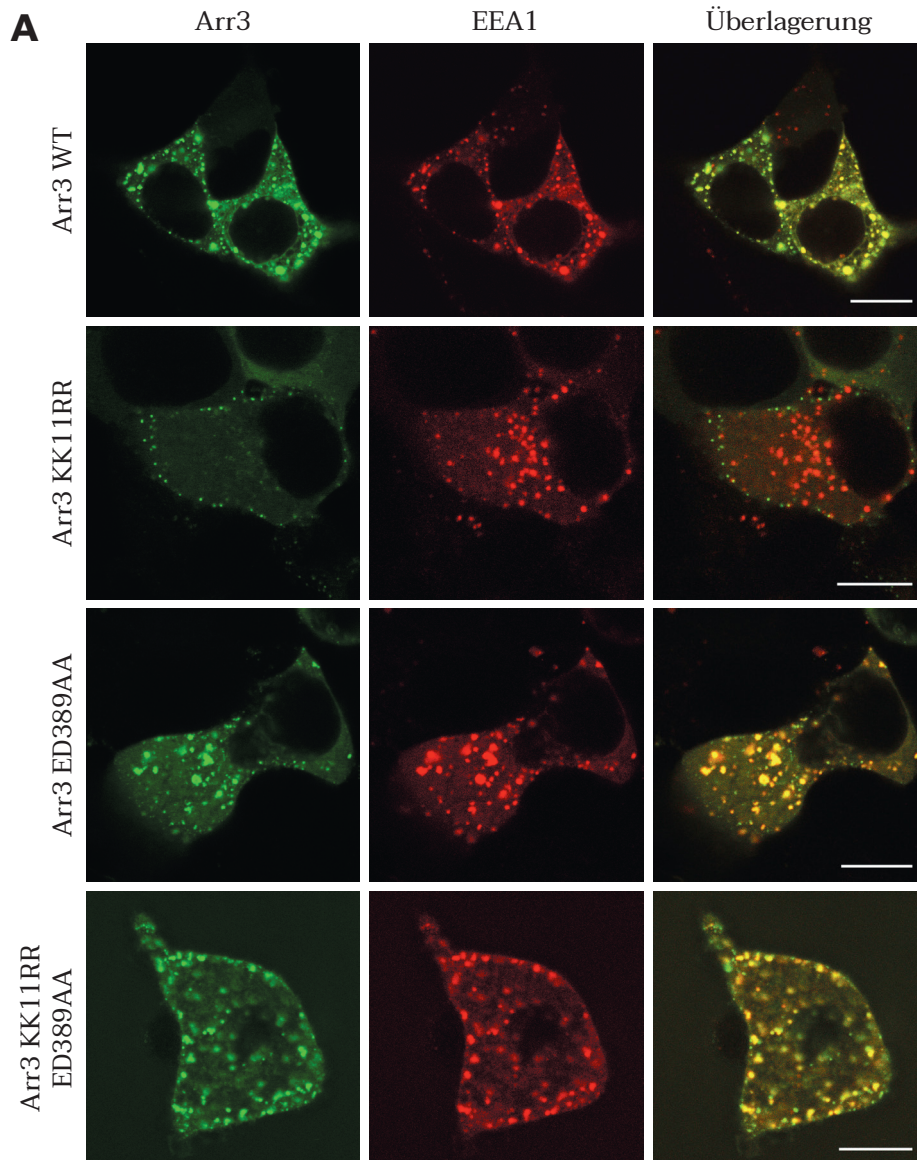


Abbildung 4.5 | Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation des V_2R

A Transient mit V_2R , GRK2, Arr3-GFP und mCherry-EEA1 transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ M AVP stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

B Die Colokalisation von EEA1 und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Arr3 WT: n = 27; Arr3 KK11RR: n = 28; Arr3 ED389AA: n = 28; Arr3 KK11RR ED389AA: n = 29 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****p < 0,0001, ns p \geq 0,05).

Obwohl Shenoy und Lefkowitz (2005) dokumentierten, dass die Doppelmutation KK11RR die Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit dem V_2R (im Gegensatz zum AT_1R) nicht beeinträchtigte, ließen sich die Ergebnisse in dieser Arbeit nicht reproduzieren, da mit dem V_2R transfizierte Zellen nach Stimulation mit 1 μM Arg-Vasopressin (AVP) kaum Arr3 KK11RR in Endosomen aufwiesen (siehe Abb. 4.5 A). Jedoch internalisierte Arr3 KK11RR ED389AA auch in diesem Fall wieder in Endosomen, ebenso wie Arr3 WT und Arr3 ED389AA. Die Quantifizierung zeigte erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Konditionen (Abb. 4.5 B).

Da die Ergebnisse mit dem V_2R in dieser Arbeit von den zuvor publizierten Daten abwichen, wurde überprüft, ob die Unterschiede der Co-Internalisierung von Arr3 KK11RR mit dem V_2R auf einer unterschiedlichen Behandlung der Zellen beruhte. Shenoy und Lefkowitz (2005) verwendeten für ihre Experimente HEK293-Zellen, die nicht mit GRK2 co-transfiziert wurden. Außerdem wurden die Zellen vor der Stimulation in serumfreiem Nährmedium gehalten. Um diese Versuche möglichst genau nachzustellen, wurde verglichen, wie sich Arr3 KK11RR in HEK293T-Zellen verhielt, wenn keine GRK2 co-transfiziert wurde oder serumfreies Nährmedium verwendet wurde. Wie in Abbildung 4.6 A dargestellt ist, führte jedoch keine dieser Maßnahmen zu einer Internalisierung von Arr3 KK11RR, wie auch an den niedrigen Colokalisationswerten zwischen EEA1 und der Arrestin-Mutante zu erkennen ist (Abb. 4.6 B).

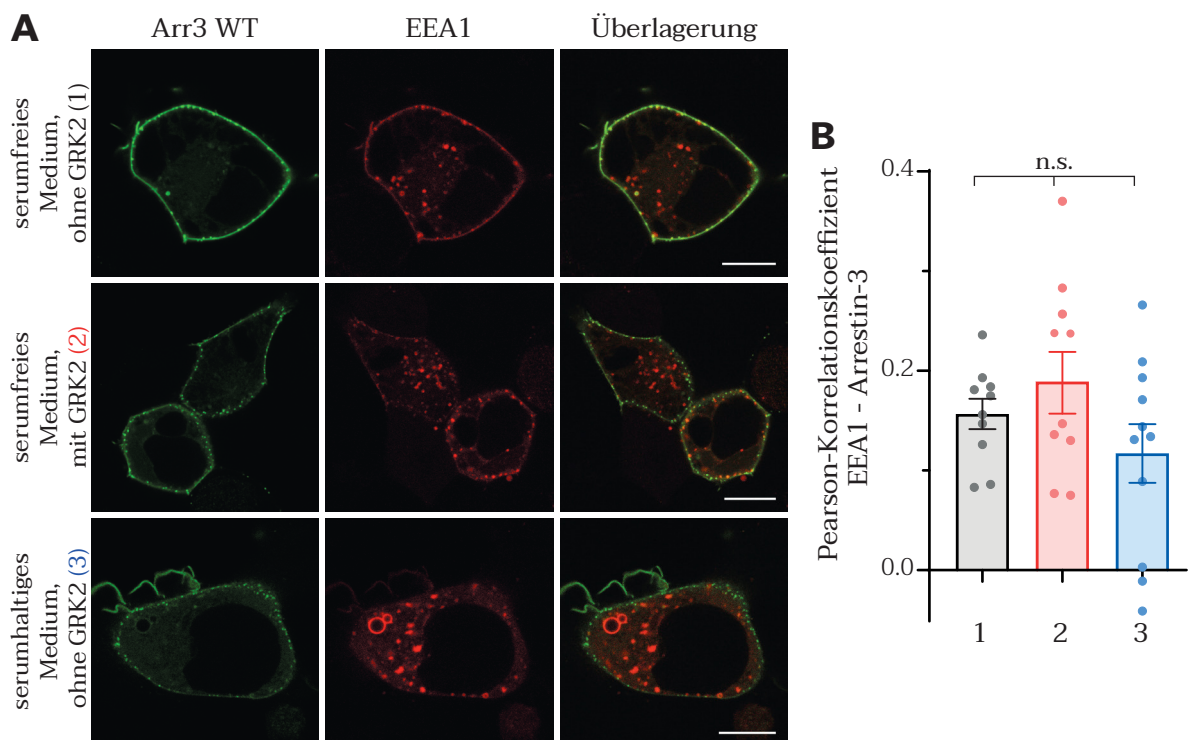


Abbildung 4.6 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 KK11RR nach Stimulation des V_2R mit serumfreiem Medium und/oder ohne GRK2

A Transient mit V_2R , Arr3-GFP, mCherry-EEA1 und GRK2 (wenn angegeben) transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37°C mit 1 μM AVP stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μm .

B Die Colokalisation von EEA1 und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Die Zahlen bezeichnen die einzelnen Konditionen: 1: serumfreies Medium, ohne GRK2 (n = 10); 2: serumfreies Medium, mit GRK2 (n = 10); 3: serumhaltiges Medium, ohne GRK2 (n = 11). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $p \geq 0,05$).

Die verminderte Co-Internalisierung von Arr3 KK11RR mit dem AT_1R wurde von Shenoy und Lefkowitz (2005) auf eine deutliche Reduktion der Arrestin-Ubiquitinierung zurückgeführt. Daher wurde untersucht, wie sich die Einführung der zusätzlichen Mutationen ED389AA oder R170E, die in den bisherigen Experimenten immer zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps geführt hatten, auf die Ubiquitinierung von Arrestin-3 auswirkt. Dazu wurde wie in Kap. 3.4.4 beschrieben Arr3-FLAG nach Stimulation des PTHR mithilfe von Anti-FLAG Affinitätsgel präzipitiert, ein Western Blot erstellt (siehe Kap. 3.4.6 – Kap. 3.4.8) und das Ubiquitinierungslevel der verschiedenen Arrestin-3-Mutanten mithilfe eines Anti-Ubiquitin-Antikörpers untersucht (Cell Signaling). Abb. 4.7 A zeigt einen repräsentativen Blot (von $n = 3$), auf welchem zu erkennen ist, dass Arr3 KK11RR deutlich weniger Ubiquitinierung aufwies als Arr3 WT, während alle weiteren Mutanten in ähnlichem Ausmaß ubiquitiniert wurden wie Arr3 WT (vgl. Abb. 4.7 B). Die Ubiquitinierung von Arr3 KK11RR ließ sich also ebenfalls sowohl durch Einfügen der aktivierenden Mutation R170E als auch durch die Verhinderung der intramolekularen Interaktionen durch die Mutation ED389AA wieder erhöhen.

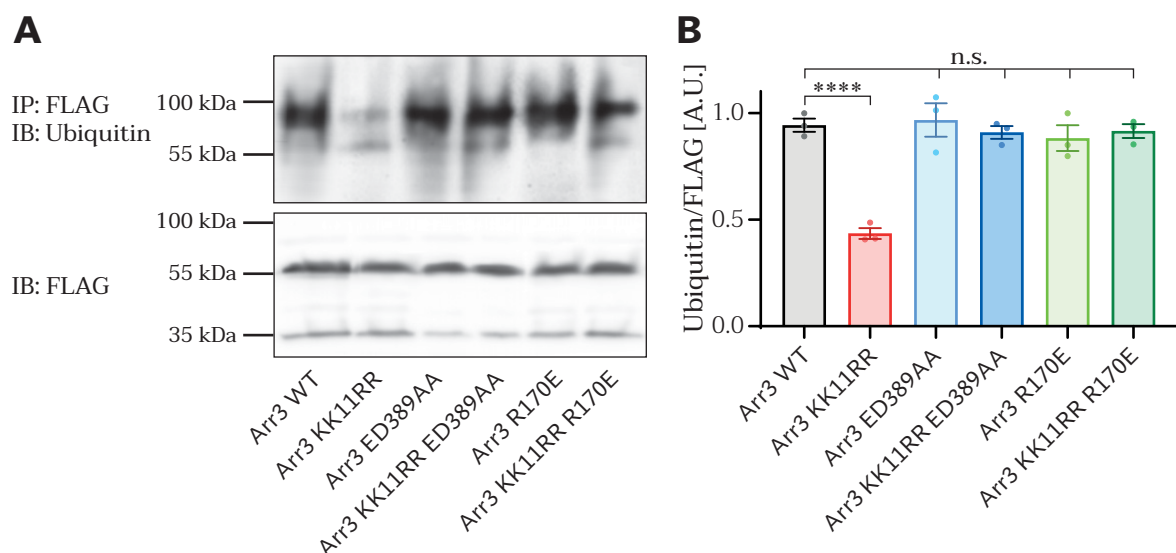


Abbildung 4.7 | Untersuchung des Ubiquitinierungslevels der Arr3-Varianten mittels Immunopräzipitation

A FLAG-markiertes Arrestin-3 wurde nach Stimulation des PTHR mit $1\mu M$ PTH 1-34 für 60 min bei $37^\circ C$ mit Anti-FLAG Affinitätsgel immunopräzipitiert. Nach Erstellung eines Western Blots aus den Präzipitaten wurde mit einem Ubiquitin-Antikörper das Ubiquitinierungslevel (oben) sowie mit einem FLAG-Antikörper die gesamte Menge des präzipitierten Arr3-FLAG untersucht (unten). Die Zahlen zeigen an, welche Arr3-Mutante verwendet wurde: 1: Arr3 WT; 2: Arr3 KK11RR; 3: Arr3 ED389AA; 4: Arr3 KK11RR ED389AA; 5: Arr3 R170E; 6: Arr3 KK11RR R170E. **B** Die Intensität der Banden wurde quantifiziert und die Werte für die Ubiquitin-Intensität durch die FLAG-Intensität dividiert ($n = 3$ unabhängige Transfektionen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (**** $p < 0,0001$, ns $p \geq 0,05$).

Insgesamt wurde durch diese Experimente bestätigt, dass Arr3 KK11RR nach dem Einfügen zusätzlicher Mutationen, die die inaktive Konformation des Arrestins destabilisieren, wieder stabile Komplexe mit Klasse-B-Rezeptoren bildet und mit diesen in die Zelle aufgenommen wird. Zur Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit Klasse-B-Rezeptoren wie dem AT_1R müssen die beiden Lysine 11 und 12 daher nicht zwingend als Ubiquitinierungsstellen zur Verfügung stehen.

4.1.2 | Identifikation von Ubiquitinierungsstellen, die die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren beeinflussen

4.1.2.1 | Untersuchung einer lysinlosen Arrestin-3-Mutante

Da bisher nicht bekannt ist, an welchen Stellen Arrestin-3 genau ubiquitiniert wird, wurde eine lysinlose Arrestin-3-Mutante generiert, in der alle Lysine durch Arginine ersetzt wurden (Arr3 noK), um die Ubiquitinierung des Proteins gänzlich zu verhindern. Mithilfe dieser Mutante sollte der Zusammenhang zwischen Ubiquitinierung und Internalisierung von Arrestin-3 untersucht werden.

Ähnliche Experimente mit einer lysinlosen Arrestin-3-Variante (β -arrestin20K) wurden bereits von Shenoy *et al.* (2007) durchgeführt. Sie beobachteten, dass β -arrestin20K nicht mit dem Klasse-B-Rezeptor V_2R zusammen internalisiert wurde und folgerten daraus, dass die Ubiquitinierung von Arrestin-3 eine wichtige Voraussetzung für die gemeinsame Internalisierung mit GPCRs darstellt. Um diesen Zusammenhang genauer zu analysieren, wurde die Interaktion der lysinlosen Arrestin-3-Mutante mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren in FRET-Experimenten untersucht.

Wie in Abb. 4.8 dargestellt ist, zeigte die lysinlose Arrestin-3-Mutante jedoch mit keinem der verwendeten Rezeptoren (β_2AR -SSS, β_2V_2R , PTHR) eine ausgeprägte Interaktion. Während Arr3 WT eine robuste Rekrutierung zu den verwendeten GPCRs aufwies, die in einer FRET-Änderung von fast 10 % bei β_2AR -SSS und β_2V_2R bzw. fast 20 % mit dem PTHR resultierte, blieb die FRET-Änderung mit Arr3 noK bei allen Rezeptoren unter 1 %. In unserem Messsystem konnte daher keine deutliche agonistvermittelte Interaktion von Arr3 noK mit den Rezeptoren beobachtet werden.

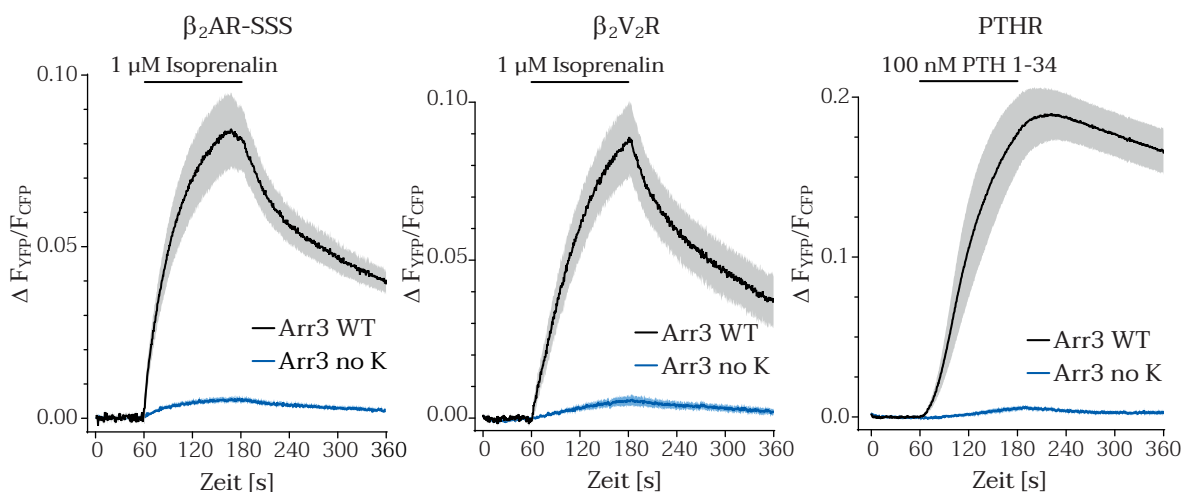


Abbildung 4.8 | Interaktion von Arr3 noK mit verschiedenen Rezeptoren in FRET-Messungen

Die FRET-Messungen zwischen CFP-markiertem Arrestin-3 und YFP-markierten Rezeptoren wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit sättigenden Agonistkonzentrationen perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die fünf letzten Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte ± SEM dargestellt (β_2AR -SSS: Arr3 WT: n = 10; Arr3 noK: n = 10; β_2V_2R : Arr3 WT: n = 10; Arr3 noK: n = 12; PTHR: Arr3 WT: n = 10; Arr3 noK: n = 11 von zwei unabhängigen Messtagen). Bei diesen Messungen wurde eine Anregungsfrequenz von 2 Hz verwendet.

Zwar konnte erneut nachgewiesen werden, dass Arrestin-3 ohne Lysine nicht in der Lage ist, mit Klasse-B-Rezeptoren zu internalisieren, wie in Abb. 4.9 für den PTHR gezeigt ist. Die schwache Rezeptorinteraktion von Arr3 noK in den FRET-Messungen wurde jedoch als unzureichend interpretiert, weshalb keine weiteren Untersuchungen mit der nicht funktionalen Arrestin-Mutante durchgeführt wurden.

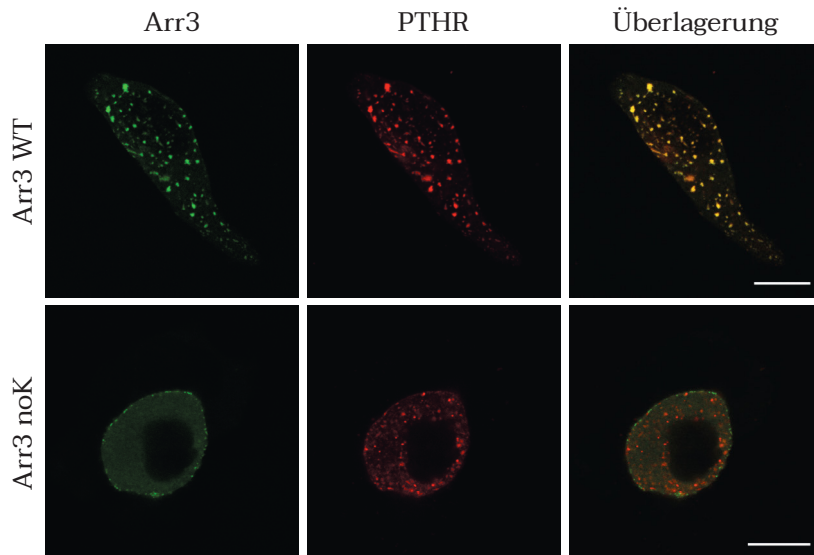


Abbildung 4.9 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 noK nach Stimulation des PTHR

Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37°C mit 1 μ M PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

4.1.2.2 | Zeitabhängige Ubiquitinierung von Arrestin-3

Um die Auswirkungen einzelner Punktmutationen von Lysinresten auf die Ubiquitinierung von Arrestin-3 zu analysieren, musste zunächst ein Assay etabliert werden, mit dem unterschiedliche Ubiquitinierungslevel verschiedener Arrestin-3-Mutanten detektiert werden konnten. Da FRET-Mikroskopie zwischen fluoreszenzmarkiertem Arrestin und Ubiquitin bei Raumtemperatur in der Vergangenheit keine Ergebnisse erzielte, ergab sich in dieser Arbeit die Idee, FRET in 96-Well-Platten zu messen, da diese im Plattenleser (Tecan Spark) auf 37 °C temperiert werden konnten. Die Interaktion zwischen Arrestin-3 und Ubiquitin wurde, wie in Kap. 3.3.2.6 beschrieben, nach Stimulation des Klasse-B-Rezeptors PTHR untersucht. Da die lysinlose (und daher nicht ubiquitinierbare) Arr3 noK-Mutante nicht funktional war (siehe Kap. 4.1.2.1), war diese als Negativkontrolle zur Messung der Arrestin-Ubiquitin-Interaktion ungeeignet. Stattdessen wurde ein phosphorylierungsdefizienter PTHR (PTHR PD) verwendet, der aufgrund der fehlenden Phosphorylierungsstellen im C-Terminus nicht in der Lage ist, Arrestin-3 zu rekrutieren und zu aktivieren (Zindel *et al.*, 2016 (PTHR PD5)), sodass keine Ubiquitinierung stattfinden kann.

In Abb. 4.10 sind die Ergebnisse der FRET-Messungen zwischen Arrestin-3 und Ubiquitin dargestellt. Die Zugabe des PTHR-Agonisten PTH 1-34 führte zu einem starken Abfall der Emissionsverhältnisse, der als Pipettierartefakt einzustufen ist. Durch die instabile *Baseline* wurden die Kurven der beiden Konditionen zum besseren Vergleich auf den ersten Messpunkt nach Agonistapplikation auf 0 normalisiert. Sowohl mit PTHR WT als auch mit PTHR PD kehrten die Emissionsratios recht schnell auf die Ausgangswerte vor der Zugabe von PTH 1-34 zurück und stiegen dann nur noch leicht an, was vermutlich auf einem Drift der *Baseline* beruht. Insgesamt konnte kein Unterschied zwischen den beiden Messgruppen festgestellt werden, sodass die FRET-Messungen zwischen Ubiquitin und Arrestin-3 in 96-Well-Platten auch bei einer physiologischen Temperatur von 37 °C keine agonistabhängige Ubiquitinierung von Arrestin-3 zeigten.

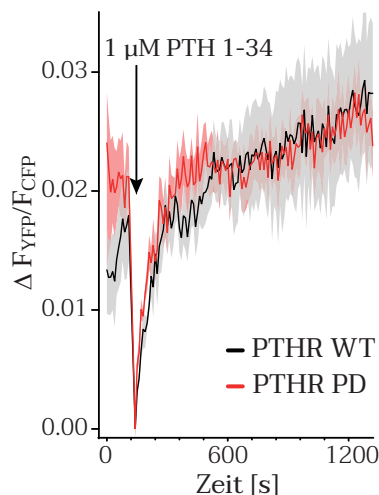


Abbildung 4.10 | Interaktion von Arr3 und Ubiquitin in FRET-Messungen

FRET-Messungen wurden am Tecan Spark zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem Ubiquitin in Anwesenheit von PTHR WT bzw. phosphorylierungsdefizientem PTHR (PTHR PD) durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.6 beschrieben. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde Agonistlösung von Hand hinzupipettiert, sodass die Endkonzentration 1 μM PTH 1-34 betrug. Alle Kurven wurden auf den Zeitpunkt der Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte ± SEM dargestellt (PTHR WT: n = 10; PTHR PD: n = 10 von zwei unabhängigen Messtagen).

Da Perroy *et al.* (2004) die Ubiquitinierung von Arrestin-3 erfolgreich mittels BRET untersuchten, wurde versucht, dies zu reproduzieren. Hierfür wurde, wie unter Kap. 3.3.3.3 beschrieben, ebenfalls das Plattenlesegerät Tecan Spark verwendet, um die Interaktion zwischen Nluc-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem Ubiquitin nach Stimulation von PTHR WT und PTHR PD zu beobachten. Obwohl diesem Experiment die Zugabe des Agonisten PTH 1-34 zu einem Anstieg der Emissionsratio führte, konnte mit dem phosphorylierungsdefizienten Rezeptor wie bei den FRET-Messungen in 96-Well-Platten kein Unterschied zum Wildtyp-Rezeptor festgestellt werden (Abb. 4.11). Es ist daher anzunehmen, dass der BRET-Anstieg nicht auf einer Arrestin-Ubiquitin-Interaktion beruhte. Daher konnten BRET-Messungen ebenfalls nicht die Ubiquitinierung des Arrestins demonstrieren.

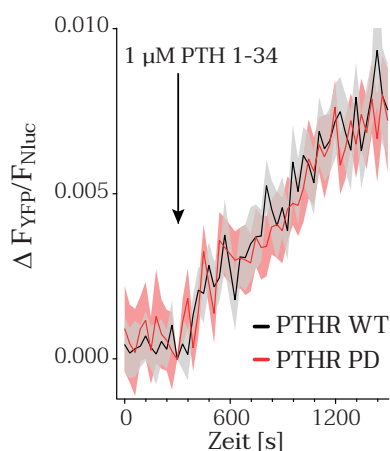


Abbildung 4.11 | Interaktion von Arr3 und Ubiquitin in BRET-Messungen

BRET-Messungen wurden am Tecan Spark zwischen Nluc-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem Ubiquitin in Anwesenheit von PTHR WT bzw. phosphorylierungsdefizientem PTHR (PTHR PD) durchgeführt, wie in Kap. 3.3.3.3 beschrieben. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde Agonistlösung von Hand hinzupipettiert, sodass die Endkonzentration 1 μ M PTH 1-34 betrug. Alle Kurven wurden auf den Zeitpunkt der Agonistgabe normalisiert und die BRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (PTHR WT: n = 30; PTHR PD: n = 20 von zwei unabhängigen Messtagen).

Stattdessen wurden die Ubiquitinierungslevel von Arrestin-3 weiter durch Immunopräzipitation von FLAG-markiertem Arrestin-3 untersucht. Dazu wurden die co-transfizierten Rezeptoren für verschiedene Zeiträume bei 37 °C mit den entsprechenden Agonisten stimuliert, bevor Arr3-FLAG präzipitiert (siehe Kap. 3.4.4) wurden. Hierbei wurde der Lysepuffer (siehe Kap. 2.8.4) sowie andere bei der Präzipitation verwendete Lösungen mit 10 mM N-Ethylmaleinimid als Deubiquitinase-Inhibitor versetzt, da hierdurch Cysteinreste im katalytischen Zentrum der Deubiquitinasen alkyliert werden. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, ein Western Blot erstellt und die Ubiquitinierung von Arrestin-3 mit einem spezifischen Antikörper visualisiert.

Wie schon mehrfach nachgewiesen wurde (Shenoy und Lefkowitz, 2003, Perroy *et al.*, 2004), konnte hier bestätigt werden, dass die Aktivierung des β_2 AR zu der für Klasse-A-Rezeptoren typischen schwachen und transienten Ubiquitinierung von Arrestin-3 führte, die nach kurzer Zeit ihr Maximum erreichte und bei fortdauernder Agoniststimulation wieder abnahm (Abb. 4.12 links).

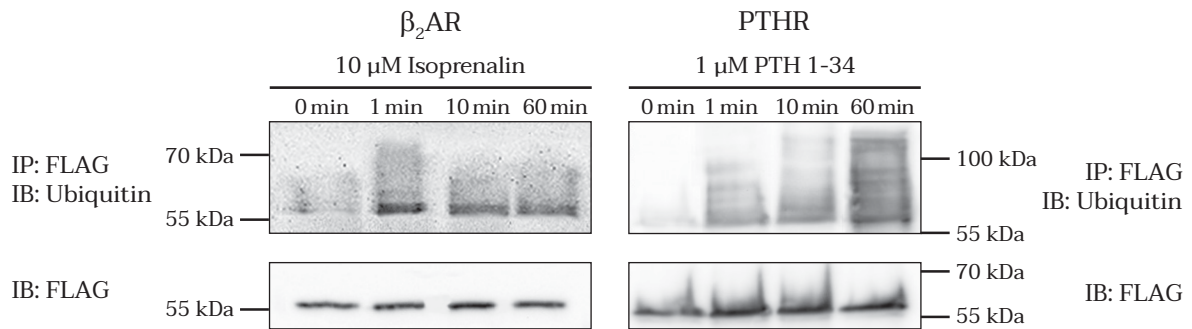


Abbildung 4.12 | Untersuchung der Ubiquitinierungslevel von Arr3 mittels Immunopräzipitation

FLAG-markiertes Arrestin-3 wurde nach Stimulation des β_2 AR mit 10 μ M bzw. des PTHR mit 1 μ M PTH 1-34 bei 37°C für den angegebenen Zeitraum mit Anti-FLAG Affinitätsigel immunopräzipitiert. Nach Erstellung eines Western Blots aus den Präzipitaten wurde mit einem Ubiquitin-Antikörper das Ubiquitinierungslevel (oben) sowie mit einem FLAG-Antikörper die gesamte Menge des präzipitiertem Arr3-FLAG untersucht (unten). Die Abbildung zeigt repräsentative Blots von drei unabhängigen Wiederholungen.

Die Aktivierung des Klasse-B-Rezeptors PTHR bewirkte hingegen eine starke Ubiquitinierung von Arrestin-3, welche zudem bei längerer Stimulation immer weiter anstieg (Abb. 4.12 rechts).

Da das höchste Ubiquitinierungslevel nach 60-minütiger Stimulation des PTHR erreicht wurde, wurde dieser Zeitraum für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Ubiquitinierung von Arrestin-3 beibehalten.

4.1.2.3 | Identifikation von Ubiquitinierungsstellen mittels Massenspektrometrie

Da die vollständige Elimination aller Lysinreste die Funktionalität des Arrestins zerstörte, sollten als nächstes nur Lysine durch Mutation entfernt werden, die tatsächlich als Ubiquitinierungsstellen dienen. Um diese zu identifizieren, wurde mittels Massenspektrometrie untersucht, welche Lysinreste agonistabhängig ubiquitiniert werden.

Ubiquitinierte Lysinreste von Proteinen können durch einen Trypsin-Verdau des zu untersuchenden Proteins und die nachgeschaltete massenspektrometrische Analyse der resultierenden Peptidfragmente detektiert werden (Polge *et al.*, 2013). Trypsin ist eine Serinprotease, die im Dünndarm an der Verdauung von Proteinen aus der Nahrung beteiligt ist und Peptidsequenzen spezifisch auf der C-terminalen Seite der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Neben ubiquitinierten Lysinresten ist eine Proteolyse durch Trypsin dagegen nicht möglich, sodass die Ubiquitinierungsstellen von Proteinen zum einen durch fehlende Spaltung hinter den entsprechenden Lysinen auffallen. Zum anderen wird Ubiquitin auch selbst durch Trypsin verdaut, z.B. in der C-terminalen Sequenz RGG, sodass an ubiquitinierten Lysinen zudem ein Diglycin-Rest verbleibt. Das durch den Verdau entstandene Gemisch tryptischer Peptide des Zielproteins (und seiner peptidischen Modifizierungen wie Ubiquitin) wird anschließend durch Hochleistungs-Massenspektrometrie analysiert und mit Proteindatenbanken verglichen. Dadurch können die einzelnen Fragmente nicht nur bestimmten Proteinsequenzen zugeordnet werden, sondern auch die Lysine, die ursprünglich mit Ubiquitin modifiziert waren, durch die Identifikation von Diglycin-Resten bestimmt werden. Der Trypsinverdau, die massenspektrometrischen Untersuchungen und die Analyse der Ergebnisse wurde von Francis Impens und Evy Timmerman (Universität Ghent, Belgien) übernommen. Zur Vorbereitung der Proben wurden HEK293T-Zellen transient mit Arrestin-3-FLAG sowie PTHR transfiziert, die Hälfte der Proben für 60 min bei 37 °C mit 1 µM PTH 1-34 inkubiert und das FLAG-markierte Arrestin-3 anschließend mithilfe von Anti-FLAG Affinitätsgele präzipitiert. Sowohl von den stimulierten als auch den unstimulierten Proben wurden jeweils drei Replikate erstellt und zur massenspektrometrischen Analyse versandt.

```

1  MGEKPGTRVFKKSSPNCKLTVYLGKRDFVDHLDKVDPVDGVVLVDPDYLK 50
51  DRKVVFVTLTCAFRYGREDLDVLGLSFRKDLFIANYQAFFPTPNPPRPPTR 100
101 LQERLLRKLGQHAHPFFFTIPQNLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDFEIRAF 150
151 CASLEEKSHKRNSVRLVIRKVQFAPEKPGQPSAETTRHFLMSDR 196
197 SLHLEASLDKELYHGEPLNVNVHVTNNSTKTVKKIKVSVRQYADICLFS 246
247 TAQYKCPVAQVEQDDQVSPSSTFCKVYTITPLLSNNREK 285
286 RGLALDGKLKHEDTNLASSTIVKEGANKEVLGLVSYRVKVKLVVSR 332
333 GGDVSVELPFVLMHPKPHDHIALPRPQSAAPETDAPVDT 371
372 NLIEFETNYATDDDIVFEDFARLRLKGLKDEDDYDDQFC 409

```

Abbildung 4.13 | In den MS-Ergebnissen identifizierte Peptidfragmente von Arrestin-3

In der Aminosäuresequenz von bovinem Arrestin-3 (kurze Isoform) wurden alle Fragmente, die Arrestin-3 zugeordnet werden konnten, mit einer hellgrünen Box unterlegt. Alle Lysine (K), die in diesen Peptidstücken enthalten sind, wurden blau hervorgehoben, während die Lysine, die nicht in den MS-Ergebnissen abgedeckt wurden, rot markiert wurden.

In Abb. 4.13 sind die Bereiche in der Aminosäuresequenz von Arrestin-3 markiert, die als Peptide in den MS-Experimenten detektiert werden konnten. Da der Fokus auf den Lysinresten lag, die als Ubiquitinerungsstellen dienen können, sind alle Lysine (K) in dieser Sequenz besonders hervorgehoben. Insgesamt konnten 46,8 % des gesamten Arrestin-3-Proteins wiedergefunden werden, wobei in diesen Bereichen auch elf der 33 Lysinreste von Arrestin-3 abgedeckt wurden, welche blau gekennzeichnet sind, während alle nicht wiedergefundenen Lysine rot markiert sind.

Abb. 4.14 verdeutlicht anhand der Oberflächendarstellung von Arrestin-3, welche Bereiche des Proteins abgedeckt werden konnten. Die identifizierten Peptide sind grün hervorgehoben, wobei die Lysinreste in diesen Bereichen blau markiert wurden. Alle nicht wiedergefundenen Lysine sind rot gekennzeichnet.

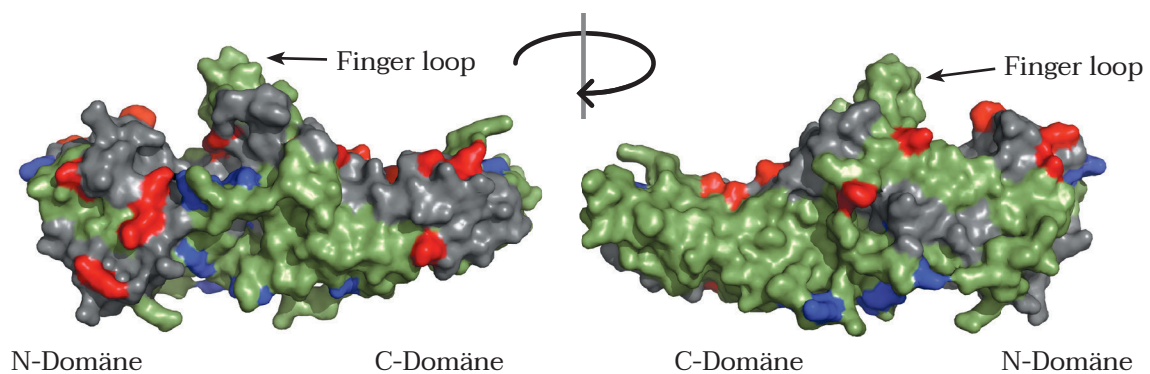


Abbildung 4.14 | Von den MS-Ergebnissen abgedeckte Bereiche in der Oberflächendarstellung von Arrestin-3 (PDB: 5TV1)

Alle Bereiche des Proteins, die identifiziert werden konnten, sind grün dargestellt. Lysinreste sind hierbei blau hervorgehoben. Nicht eingeschlossene Lysinreste sind rot markiert.

Interessanterweise wurde am Lysin in Position 178 von Arrestin-3 in den zuvor stimulierten Proben ein Gly-Gly-Rest als Zeichen einer vorherigen Ubiquitinierung identifiziert, wohingegen die entsprechende Stelle in unstimulierten Proben unverändert war. Es ist daher wahrscheinlich, dass Arrestin-3 nach Stimulation des PTHR an K178 ubiquitiniert wird. In Abb. 4.15 ist der entsprechende Lysinrest dargestellt, der auf der Seite des Arrestins liegt, die nicht an der Rezeptorinteraktion beteiligt ist und daher grundsätzlich für Ubiquitinligasen erreichbar sein sollte. In weiteren Versuchen sollte daher untersucht werden, welche Auswirkung die Elimination dieser Ubiquitinerungsstelle von Arrestin-3 auf das Verhalten des Proteins hat.

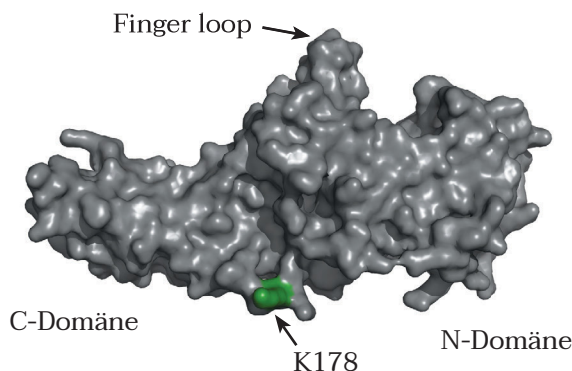


Abbildung 4.15 | Lokalisation von K178 in der Oberflächendarstellung von Arrestin-3 (PDB: 5TV1)

4.1.2.4 | Untersuchung der Punktmutation K178R

Um die Ubiquitinierung des identifizierten Lysinrests K178 von Arrestin-3 zu unterbinden, wurde die Aminosäure in einem konservativen Austausch zu Arginin mutiert (Arr3 K178R) und wurde anschließend in unseren Messsystemen mit Wildtyp-Arrestin verglichen. Dadurch sollte der Einfluss der nachgewiesenen Ubiquitinierungsstelle das Verhalten von Arrestin-3 untersucht werden.

Zunächst wurde in FRET-Messungen die Interaktion der Arrestin-Varianten mit dem PTHR überprüft, da dieser Rezeptor auch zur Aktivierung und damit Ubiquitinierung von Arrestin vor den MS-Analysen verwendet wurde. Wie in Abb. 4.16 dargestellt ist, wiesen sowohl Arr3 WT als auch Arr3 K178R eine robuste Rekrutierung zum PTHR auf. Die deutliche Verzögerung zwischen Agonistzugabe (vgl. Balken) und Anstieg der Emissionsratio ist bei derartigen Messungen typisch für peptidische Liganden, ebenso wie die Tatsache, dass ein Umspülen der Zellen mit FRET-Puffer nach der Agoniststimulation kaum in der Lage war, den gebundenen Liganden auszuwaschen und sich somit nur eine sehr langsame Auswaschkinetik beobachten ließ. Da die Kurven von Arr3 WT und Arr3 K178R insgesamt sehr ähnlich verliefen, wurde die agonistinduzierte Rekrutierung von Arrestin-3 zum PTHR durch die Mutation der Ubiquitinierungsstelle jedoch offensichtlich nicht beeinträchtigt.

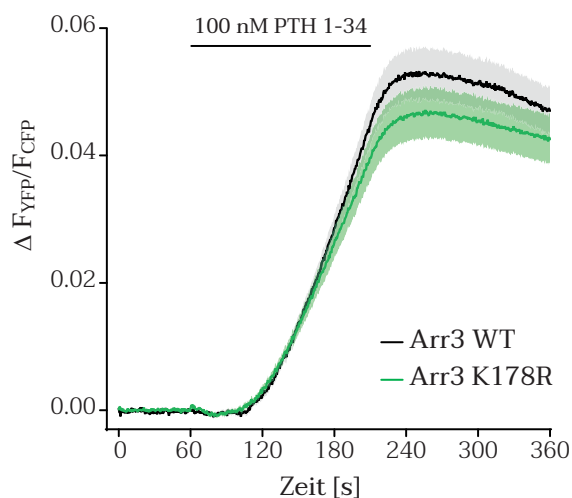


Abbildung 4.16 | Interaktion von Arr3 K178R mit dem PTHR in FRET-Messungen

Die FRET-Messungen zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem PTHR wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit 100 nM PTH 1-34 perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die letzten fünf Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (Arr3 WT: $n = 18$; Arr3 K178R: $n = 170$ von drei unabhängigen Messtagen). Bei diesen Messungen wurden Bilder mit einer Frequenz von 2 Hz aufgenommen.

Im Folgenden wurde die Co-Internalisierung von Arr3 K178R mit dem PTHR nach 30-minütiger Stimulation mit PTH 1-34 mittels Konfokalmikroskopie analysiert. In Abb. 4.17 A sind repräsentative Bilder von Zellen dargestellt, die mit rot fluoreszierenden Rezeptoren und grün fluoreszierenden Arrestin-Varianten transfiziert wurden. Sowohl Arr3 WT als auch Arr3 K178R wurden internalisiert und lokalisierten mit den Rezeptoren zusammen in Endosomen. Die Quantifizierung der Colokalisation zwischen Arrestinen und Rezeptoren zeigte ebenfalls keine signifikant unterschiedlichen Pearson-Korrelationskoeffizienten (Abb. 4.17 B). Die Internalisierung von Arrestin-3 mit dem Klasse-B-Rezeptor wurde durch die Elimination der Ubiquitinierungsstelle K178 somit nicht verringert.

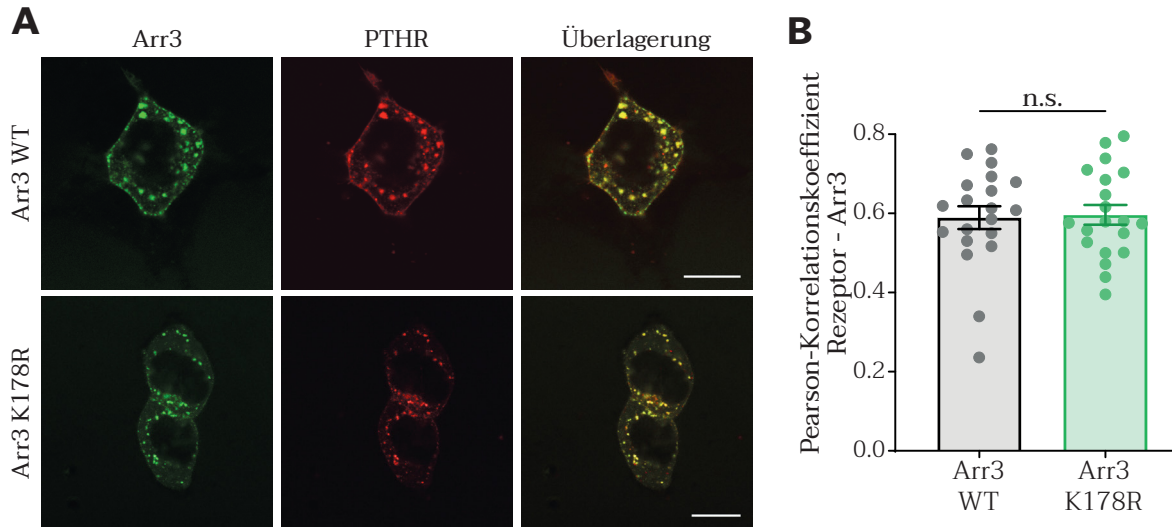


Abbildung 4.17 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 K178R nach Stimulation des PTHR

A Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ M PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.
B Die Colokalisation von PTHR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mittels Pearson-Korrelationskoeffizient quantifiziert (Arr3 WT: n = 20; Arr3 K178R: n = 20 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (ns $p \geq 0,05$).

Die Untersuchung der Ubiquitinierungslevel beider Arrestine nach 60-minütiger Stimulation des PTHR ergab, dass die Mutation K178R die Ubiquitinierung von Arrestin-3 zwar signifikant reduzierte (Abb. 4.18 A), das Ubiquitinierungslevel von Arr3 K178R jedoch immer noch etwa 75 % der Ubiquitinierung von Arr3 WT betrug (Abb. 4.18 B).

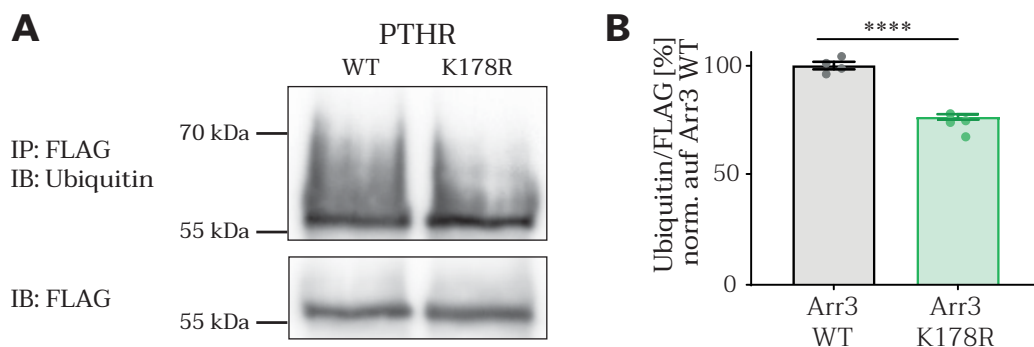


Abbildung 4.18 | Untersuchung des Ubiquitinierungslevels von Arr3 K178R mittels Immunopräzipitation

A FLAG-markiertes Arrestin-3 wurde nach Stimulation des PTHR mit 1 μ M PTH 1-34 für 60 min bei 37 °C mit Anti-FLAG Affinitätsgel immunopräzipitiert. Nach Erstellung eines Western Blots aus den Präzipitaten wurde mit einem Ubiquitin-Antikörper das Ubiquitinierungslevel (oben) sowie mit einem FLAG-Antikörper die gesamte Menge des präzipitiertem Arr3-FLAG untersucht (unten).
B Die Intensitäten wurden quantifiziert und die Werte für die Ubiquitin-Intensität durch die FLAG-Intensität dividiert (n = 4 unabhängige Transfektionen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (**** $p < 0,0001$).

Bei der Durchführung der Western Blots zur Analyse der Ubiquitinierungslevel fiel auf, dass Arr3 K178R bei Transfektion gleicher DNA-Mengen scheinbar deutlich besser exprimiert wurde als Arr3 WT. Daher wurden in einem vorherigen Versuch unterschiedliche Mengen von Arr3 K178R transfiziert, deren Expressionslevel nach Erstellung eines Western Blots aus den Zelllysaten mit Arr3 WT verglichen wurden. Zur Ladungskontrolle wurde Arr3-FLAG im Verhältnis zur aufgetragenen Menge an Aktin beurteilt. Dabei wurde deutlich, dass bei Transfektion gleicher DNA-Mengen (1,0 µg) beinahe die 1,5-fache Menge an Arr3 K178R in den Zellen exprimiert wurde, wohingegen für ähnliche Expressionslevel gegenüber 1,0 µg Arr3 WT nur ca. 0,7 µg Arr3 K178R nötig waren (siehe Abb. 4.19 A, B). Nach diesem Ergebnis wurde auch ein weiterer Blot zum besseren Vergleich der Ubiquitinierung von Arr3 K178R erstellt (vgl. Abb. 4.18 A).

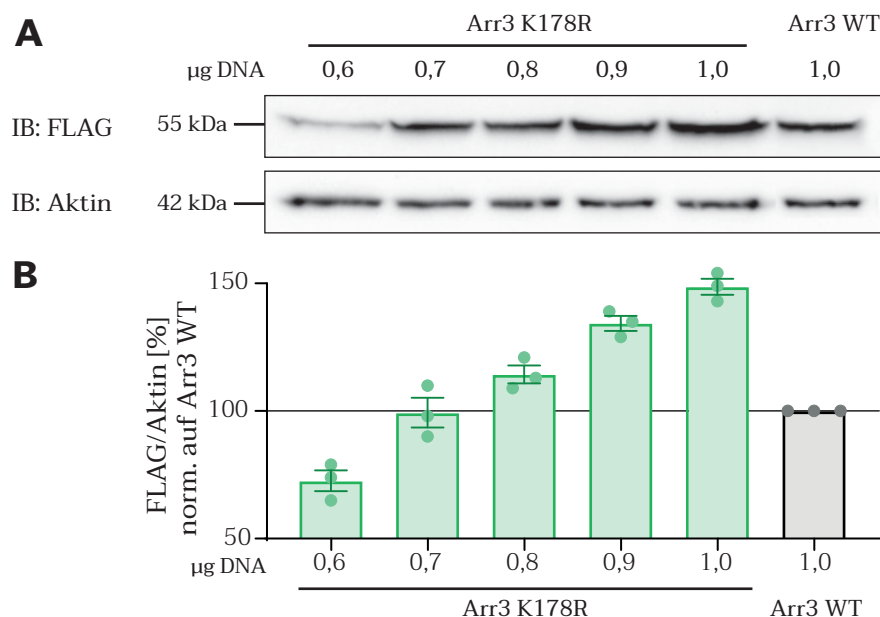


Abbildung 4.19 | Untersuchung der Expression von Arr3 K178R mittels Western Blot

A Mit der angegebenen Menge DNA transfizierte Zellen wurden lysiert und je 40 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Nach Erstellung eines Western Blots wurde mit einem FLAG-Antikörper das Expressionslevel von Arr3 K178R mit Arr3 WT verglichen (oben). Als Beladungskontrolle wurde ein Aktin-Antikörper verwendet (unten).

B Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert und die Werte für die FLAG-Intensität durch die Aktin-Intensität dividiert. Zum besseren Vergleich wurden die Werte auf Arr3 WT normalisiert (n = 3 unabhängige Transfektionen).

Es stellte sich jedoch die Frage, ob die unterschiedlichen Proteinmengen nach der Transfektion gleicher DNA-Mengen wirklich auf der besseren Expression von Arr3 K178R beruhte, da die reduzierte Ubiquitinierung von Arr3 K178R auch zum verringerten Abbau der markierten Proteine durch Proteasomen geführt haben könnte. Aus diesem Grund wurde mittels Cycloheximid-Behandlung der Zellen die Stabilitäten der FLAG-markierten Arrestine untersucht. Cycloheximid (CHX) unterdrückt als Translationshemmer die Synthese neuer Proteine, sodass beobachtet werden kann, wie die zum Zeitpunkt der CHX-Behandlung in der Zelle vorhandenen Proteine nach und nach abgebaut werden. Nach der angegebenen Behandlungsdauer wurden die HEK293T-Zellen lysiert und die Mengen an Arrestin-3, die noch vorhanden waren, mittels Western Blot untersucht.

Die repräsentativen Blots in Abb. 4.20 A belegen, dass Arr3 WT mit fortdauernder CHX-Behandlung deutlich schneller abgebaut wurde, als dies für Arr3 K178R der Fall war. Die Quantifizierung der Proteinmengen ergab, dass schon ab einer 16-stündigen CHX-Inkubation signifikant mehr Arr3 K178R vorhanden blieb als Arr3 WT und der Unterschied bei längerer Behandlung immer größer wurde (Abb. 4.20 B).

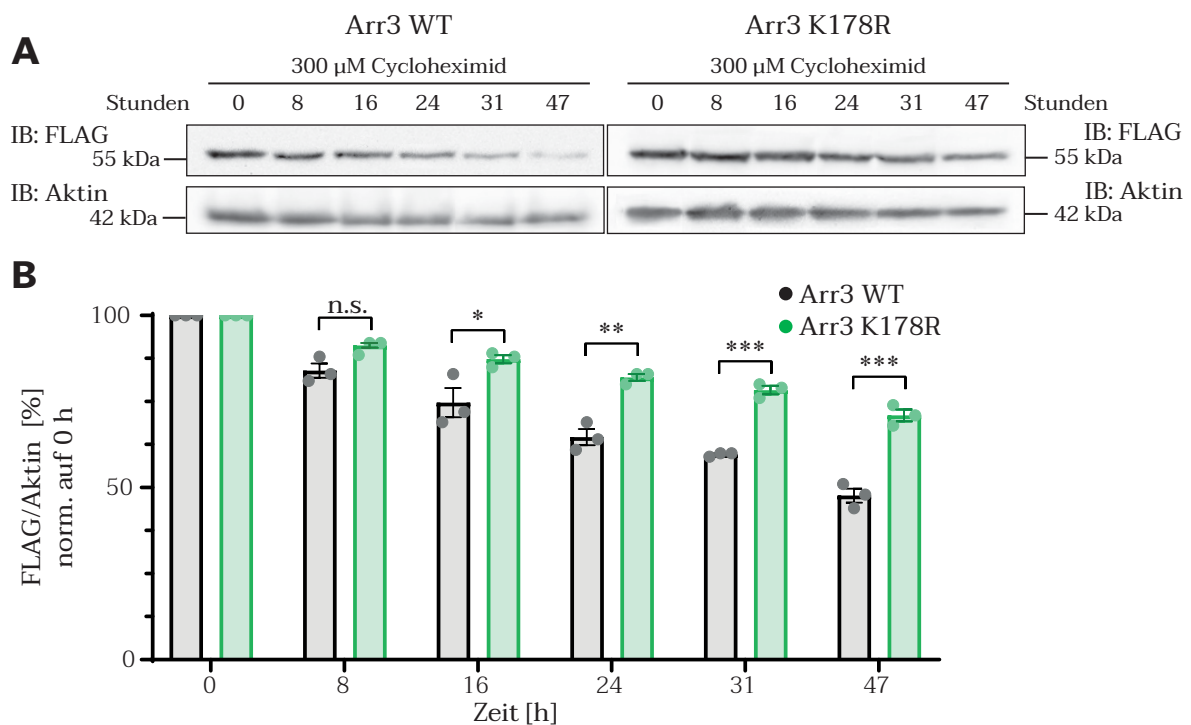


Abbildung 4.20 | Untersuchung der Proteinstabilität von Arr3 K178R mittels Cycloheximid

A 24 Stunden nach der Transfektion mit Arr3-FLAG-Varianten wurden die Zellen für den angegebenen Zeitraum mit 300 μ M CHX inkubiert, lysiert und je 40 μ g Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Erstellung eines Western Blots wurde mit einem FLAG-Antikörper die Proteinmenge von Arr3 WT und Arr3 K178R verglichen. Als Beladungskontrolle wurde ein Aktin-Antikörper verwendet.

B Die Intensität der Banden wurde quantifiziert und die Werte für die FLAG-Intensität durch die Aktin-Intensität dividiert. Zum besseren Vergleich wurden die Werte auf die unbehandelte Kontrolle (0 Stunden) normalisiert ($n = 3$ unabhängige Transfektionen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt ($***p < 0,001$).

Somit wird deutlich, dass Arr3 K178R tatsächlich langsamer abgebaut wird als Arr3 WT und daher eine höhere Proteinstabilität aufweist. Auf die Interaktion mit dem PTHR und speziell auf die Co-Internalisierung mit dem Klasse-B-Rezeptor hat die Mutation der in MS-Analysen identifizierten Ubiquitinierungsstelle jedoch keinen Einfluss (siehe Abb. 4.17). Da die Ubiquitinierung von Arr3 K178R nur um ca. 25 % reduziert, aber nicht komplett beseitigt war, wurde vermutet, dass weitere Lysinreste ubiquitiniert werden können.

4.1.2.5 | Untersuchung weiterer Lysin-zu-Arginin-Punktmutationen

Da die massenspektrometrische Analyse nur eine einzige Ubiquitinierungsstelle in Arrestin-3 aufgedeckt hatte, wurden in einer Literaturrecherche sieben weitere Lysine ermittelt, die in Proteomanalysen als Ubiquitinierungsstellen identifiziert worden waren. Diese sind in Abb. 4.21 in der Oberflächenstruktur von Arrestin-3 hervorgehoben.

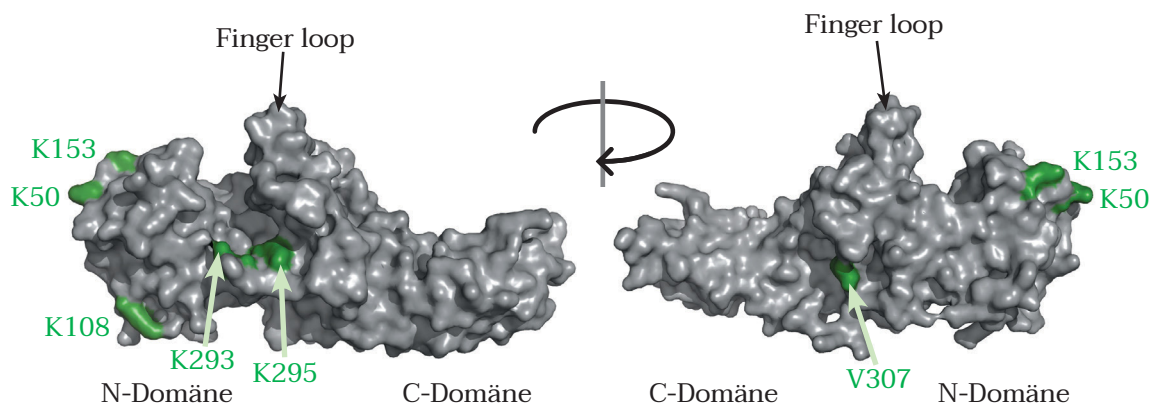


Abbildung 4.21 | Lokalisation der ausgewählten Ubiquitinierungsstellen in der Oberflächendarstellung von Arrestin-3 (PDB: 5TV1)

Die Lysinreste, welche in weiteren Experimenten zu Argininen mutiert werden sollten, sind in grün hervorgehoben. Da K308 in der Kristallstruktur nicht aufgelöst werden konnte, wurde stattdessen das benachbarte V307 markiert. K397 befindet sich im flexiblen C-Terminus von Arrestin-3 und ist daher in der Kristallstruktur ebenfalls nicht dargestellt.

Interessanterweise ist das Lysin an Position 178 die am häufigsten in der Literatur beschriebene Ubiquitinierungsstelle von Arrestin-3 (Akimov *et al.*, 2018, Kim *et al.*, 2011, Stes *et al.*, 2014, Udeshi *et al.*, 2013), wodurch unsere Experimente bestätigt wurden. Zudem wurden K50 (Akimov *et al.*, 2018, Sarraf *et al.*, 2013, Stes *et al.*, 2014), K108 (Udeshi *et al.*, 2013), K153 (Stes *et al.*, 2014, Udeshi *et al.*, 2013), K293 (Udeshi *et al.*, 2013), K295 (Akimov *et al.*, 2018), K308 (Akimov *et al.*, 2018) und K397 (Stes *et al.*, 2014) als Ubiquitinierungsstellen beschrieben und in dieser Arbeit für weitere Experimente adressiert.

Um die Ubiquitinierung an diesen Positionen zu blockieren, wurden auch diese Lysine zu Argininen mutiert, sodass sieben weitere Einzelmutanten entstanden, die ebenfalls in unseren Messsystemen untersucht wurden.

Die neuen Mutanten wurden dieses Mal mit einem anderen Klasse-B-Rezeptor, dem β_2V_2R , untersucht, da der Agonist Isoprenalin weniger stark am Rezeptor bindet und somit im Gegensatz zum PTHR (vgl. Abb. 4.16) die Auswasch-Kinetik der Arrestin-3-Varianten verglichen werden konnte. Wie in Abb. 4.22 A dargestellt ist, wurden alle Arrestin-3-Mutanten zum β_2V_2R rekrutiert und unterschieden sich in der off-Kinetik, anhand der die Dissoziationsgeschwindigkeit des Arrestins vom Rezeptor beurteilt werden kann, nicht signifikant vom Wildtyp-Arrestin. Die Interaktion dieser Arrestine mit dem β_2V_2R wurde durch den Austausch der gewählten Lysine, die zum Teil an der Bindung des phosphorylierten C-Terminus von GPCRs beteiligt sind (Ostermaier *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2017, Mafi *et al.*, 2020), also nicht beeinträchtigt und alle Arrestin-3-Einzelmutanten waren noch funktional.

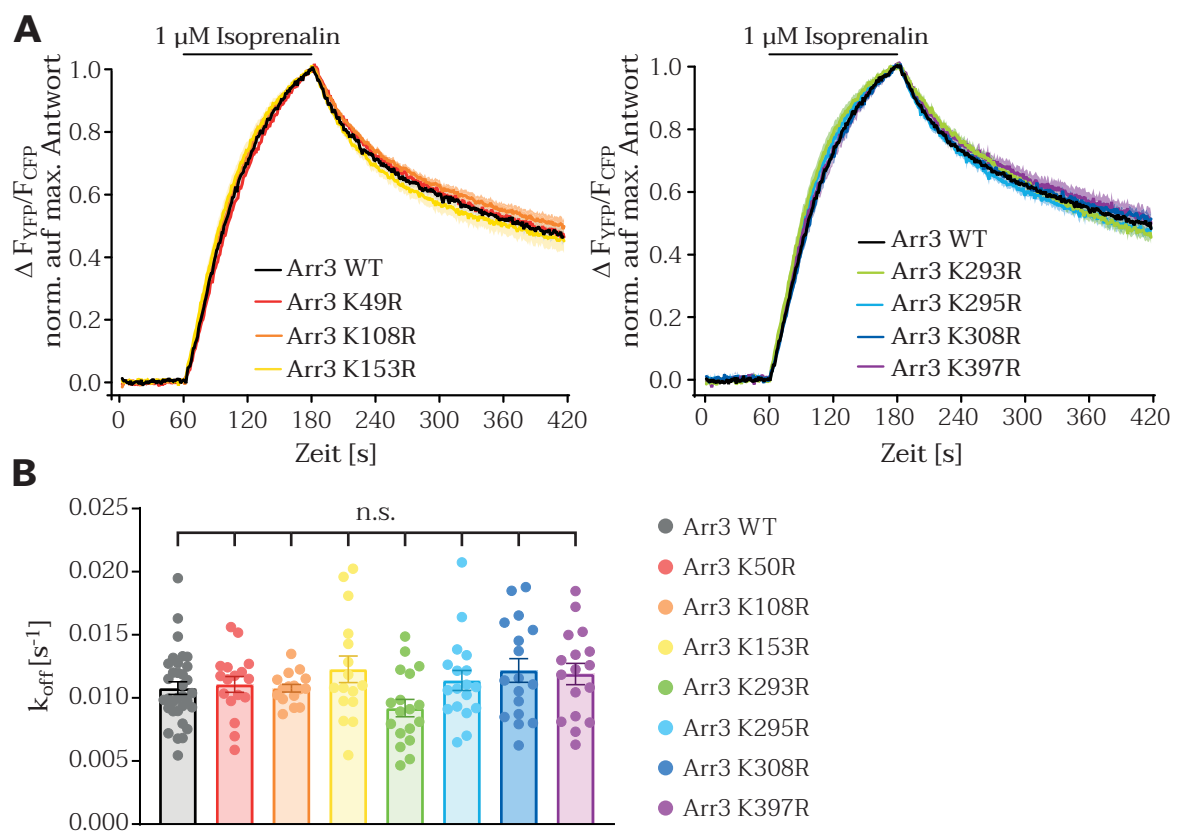


Abbildung 4.22 | Interaktion der Arr3-Einzelmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen

A Die FRET-Messungen zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem β_2V_2R wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit 1 μM Isoprenalin perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die fünf letzten Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

B Die Auswaschkinetik jeder einzelnen Kurve wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung quantifiziert und die k_{off} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (Arr3 WT: n = 33 von sechs Messtagen; Arr3 K50R: n = 17; Arr3 K108R: n = 16; Arr3 K153R: n = 16; Arr3 K293R: n = 18; Arr3 K295R: n = 18; Arr3 K308R: n = 17; Arr3 K398R: n = 17 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $p \geq 0,05$).

Die Untersuchung der Co-Internalisierung der Arrestin-Mutanten mit dem PTHR zeigte jedoch trotz der Mutation einzelner potentieller Ubiquitinierungsstellen erneut, dass alle Arrestin-3-Varianten noch in der Lage waren, in Endosomen transportiert zu werden (Abb. 4.23). Die Quantifizierung der Colokalisation von Arrestinen und Rezeptoren wies daher ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Mutanten und Wildtyp-Arrestin-3 auf (Abb. 4.24). Dies betont, dass einzelne Lysin-zu-Arginin-Mutationen und damit die Blockade der Ubiquitinierung an jeweils einer Stelle keine negative Auswirkung auf die Internalisierung von Arrestin-3 hatte.

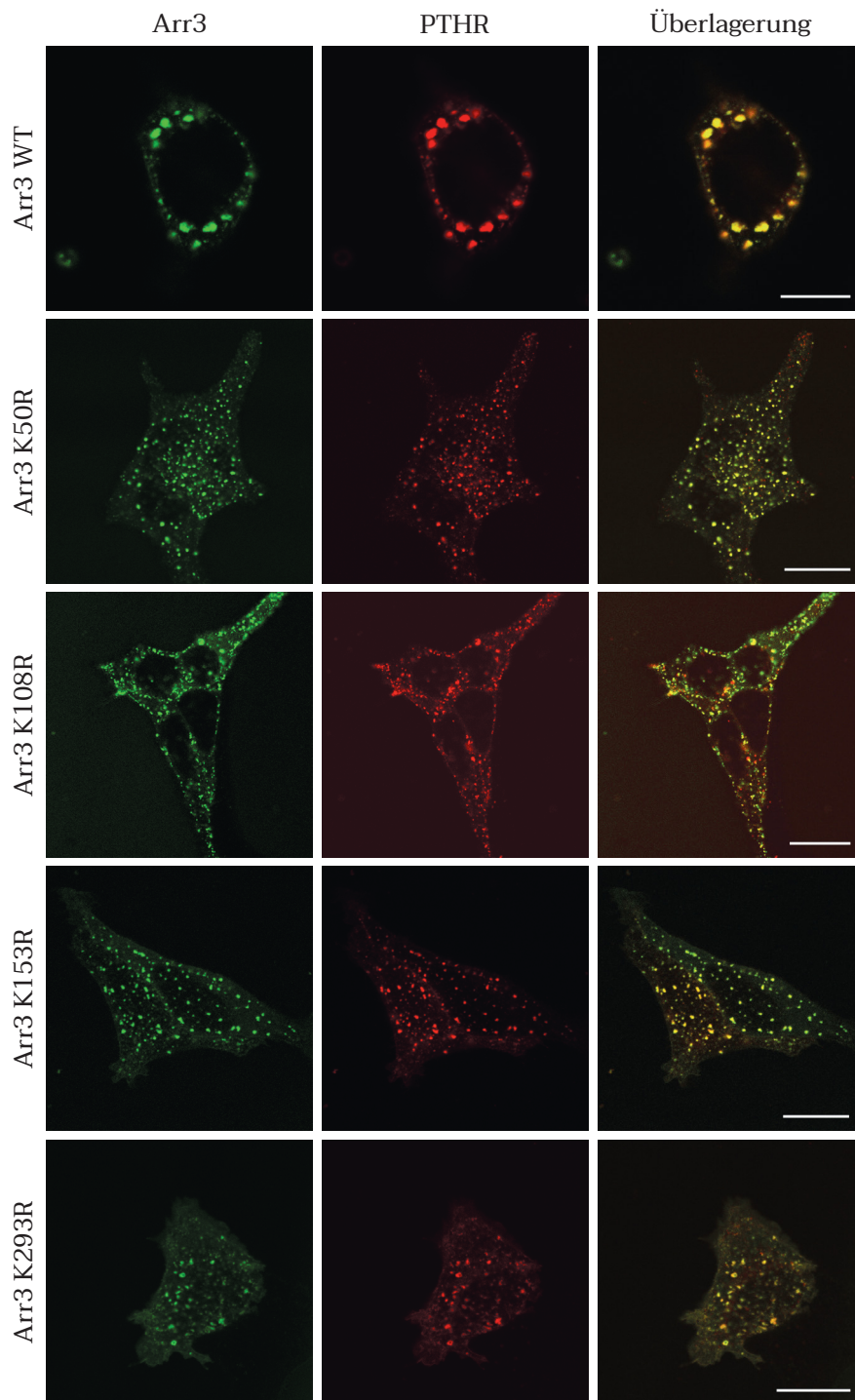


Abbildung 4.23 | Zelluläre Lokalisation der Arr3-Einzelmutanten nach Stimulation des PTHR

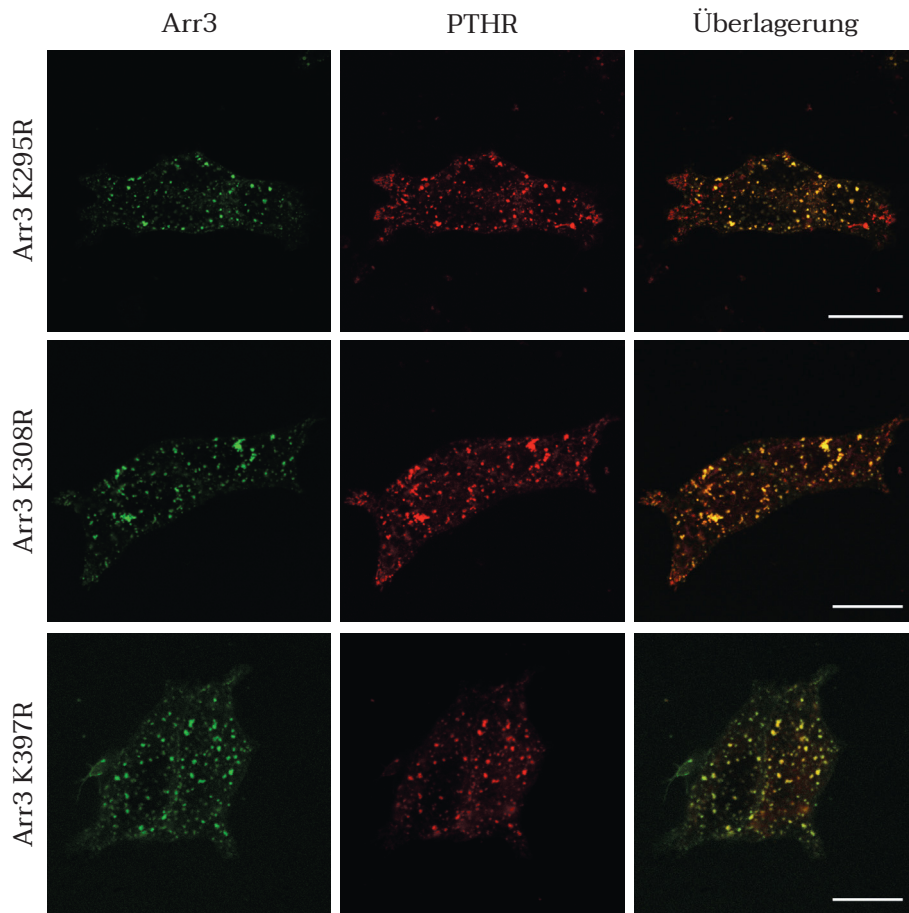


Abbildung 4.23 | Zelluläre Lokalisation der Arr3-Einzelmutanten nach Stimulation des PTHR

Transient mit Arr3-GFP, mCherry-markiertem PTHR und GRK2 transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37°C mit 1 µM PTH1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 µm.



Abbildung 4.24 | Quantifizierung der Colokalisation zwischen PTHR und den Arrestin-3-Einzelmutanten

Die Colokalisation zwischen PTHR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Arr3 WT: n = 30; Arr3 K50R: n = 29; Arr3 K108R: n = 28; Arr3 K153R: n = 29; Arr3 K293R: n = 28; Arr3 K295R: n = 28; Arr3 K308R: n = 29; Arr3 K398R: n = 30 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns p ≥ 0,05).

Um herauszufinden, wie stark die Arrestin-3-Einzelmutanten noch ubiquitiniert werden können, wurden erneut FLAG-markierte Arrestin-3-Varianten nach 60-minütiger Stimulation des PTHR präzipitiert und die Ubiquitinierungslevel mittels Western Blot mit Wildtyp-Arrestin-3 verglichen. Abb. 4.25 A zeigt anhand eines repräsentativen Blots, dass die meisten Arrestin-3-Mutanten eine reduzierte Ubiquitinierung aufwiesen, was durch die Quantifizierung der Bandenintensitäten bestätigt wurde (Abb. 4.25 B). Lediglich Arr3 K293R und Arr3 K295R wiesen im Vergleich zu Arr3 WT ein weitgehend unverändertes Ubiquitinierungslevel auf und sind daher für die Ubiquitinierung von Arrestin-3 vermutlich nicht relevant.

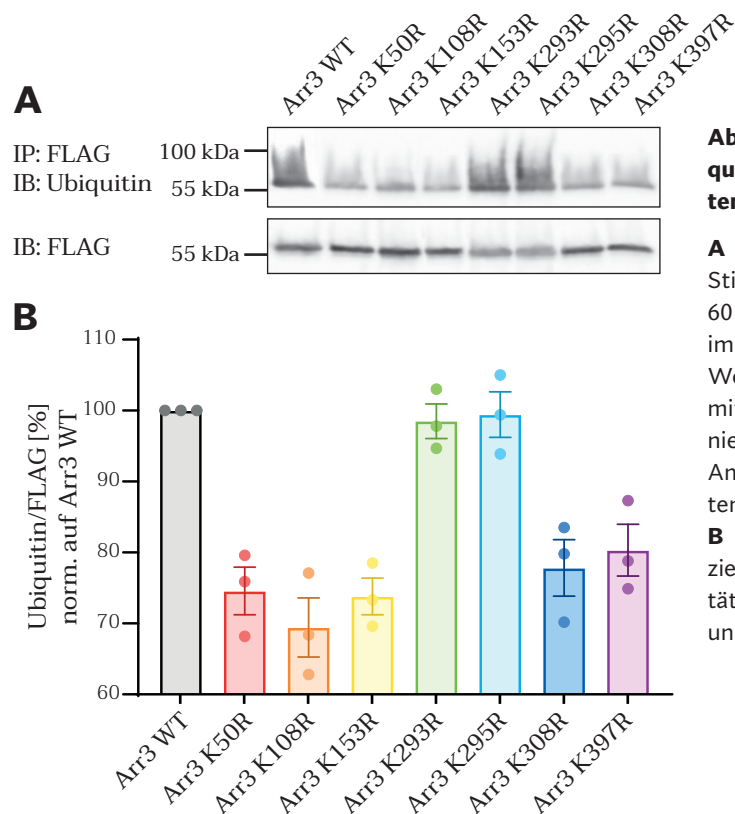


Abbildung 4.25 | Untersuchung des Ubiquitinierungslevels der Arr3-Einzelmutanten mittels Immunopräzipitation

A FLAG-markiertes Arrestin-3 wurde nach Stimulation des PTHR mit 1 μ M PTH 1-34 für 60 min bei 37 °C mit Anti-FLAG Affinitätsgele immunopräzipitiert. Nach Erstellung eines Western Blots aus den Präzipitaten wurde mit einem Ubiquitin-Antikörper das Ubiquitinierungslevel (oben) sowie mit einem FLAG-Antikörper die gesamte Menge des präzipitierten Arr3-FLAG untersucht (unten).

B Die Intensität der Banden wurde quantifiziert und die Werte für die Ubiquitin-Intensität durch die FLAG-Intensität dividiert ($n = 3$ unabhängige Transfektionen).

4.1.2.6 | Kombination der Punktmutationen in Mehrfachmutanten

Untersuchung von Arr3 8K→R und Arr3 6K→R

Da bisher keine der Lysin-zu-Arginin-Einzelmutationen eine Auswirkung auf das Verhalten von Arrestin-3 hatte, vor allem bezüglich der Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren, wurden alle bisher untersuchten Mutationen in einer Arrestin-3-Mehrfachmutante vereinigt und analysiert (Arr3 8K→R = Arr3 K50R K108R K153R K178R K293R K295R K308R K397R). Da die Lysine K293 und K295 in unseren Experimenten nicht als Ubiquitinierungsstellen dienten (vgl. Abb. 4.25), wurde zudem eine weitere Arrestin-3-Sechsfachmutante erstellt, in der diese beiden Aminosäuren nicht ausgetauscht wurden (Arr3 6K→R = Arr3 K50R K108R K153R K178R K308R K397R).

Diese Arrestin-3-Mehrfachmutanten wurden zunächst in FRET-Experimenten zusammen mit dem β_2V_2R analysiert und konnten ebenfalls mit dem Rezeptor interagieren, ohne statistisch signifikante Unterschiede in der off-Kinetik gegenüber Arr3 WT zu zeigen (Abb. 4.26 A, B).

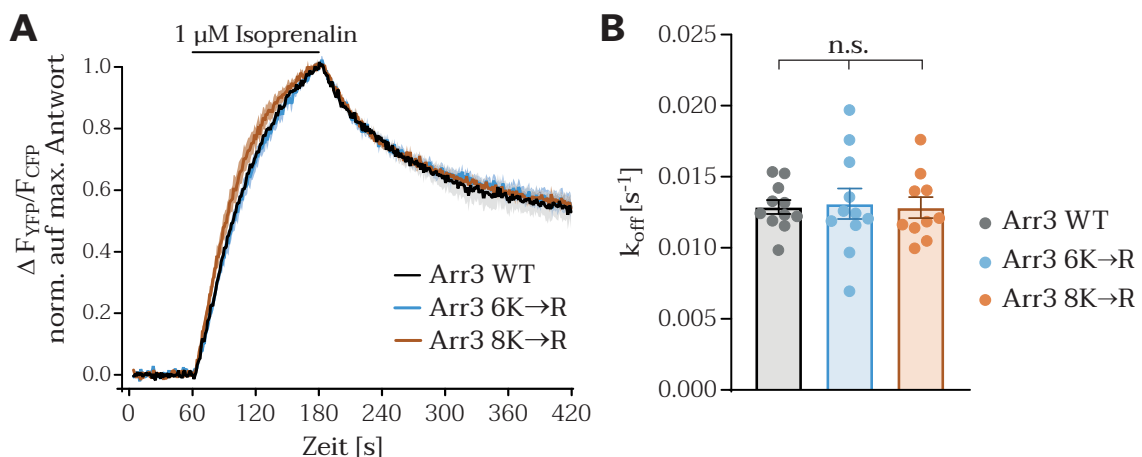


Abbildung 4.26 | Interaktion der Arr3-Mehrfachmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen

A Die FRET-Messungen zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem β_2V_2R wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit 1 μM Isoprenalin perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die fünf letzten Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

B Die Auswaschkinetik jeder einzelnen Kurve wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung quantifiziert und die k_{off} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (Arr3 WT: n = 11; Arr3 6K→R: n = 11; Arr3 8K→R: n = 10 von zwei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns p \geq 0,05).

Bei der Co-Internalisierung verhielten sich beide Arrestin-3-Mutanten nach 30-minütiger Stimulation des PTHR mit 1 μ M PTH 1-34 jedoch anders als Wildtyp-Arrestin. Sowohl für Arr3 8K→R als auch für Arr3 6K→R gab es jeweils Zellen, in denen die Arrestin-3-Mutante nach wie vor in der Lage war, mit dem Rezeptor in die Zelle aufgenommen zu werden. Gleichzeitig gab es in beiden Konditionen jedoch auch Zellen, in denen das grün fluoreszierende Arrestin-3 zwar zur Zellmembran rekrutiert wurde, die rot leuchtenden Rezeptoren jedoch alleine in Endosomen lokalisierten (siehe Abb. 4.27 A). Die Quantifizierung der Colokalisation von Rezeptoren und Arrestinen zeigt daher für beide Mutanten eine sehr breite Streuung des Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen 0 und 0,8 (Abb. 4.27 B). Selbst eine Erhöhung der Agonistkonzentration auf 10 μ M oder eine längere Stimulation der Rezeptoren für 60 min konnte am unklaren Internalisierungsverhalten der Arrestin-3-Mehrfachmutanten nichts ändern (Daten nicht abgebildet). Eine unterschiedliche Behandlung der Zellen kann jedoch ausgeschlossen werden, da an jedem Messtag nur ein mit Zellen bewachsenes Deckgläschen verwendet wurde, auf dem immer Zellen beider Kategorien zu finden waren. Auch eine separierte Lokalisation der beiden Zellgruppen auf diesen Deckgläschen konnte ebenfalls unter keinen Bedingungen beobachtet werden.

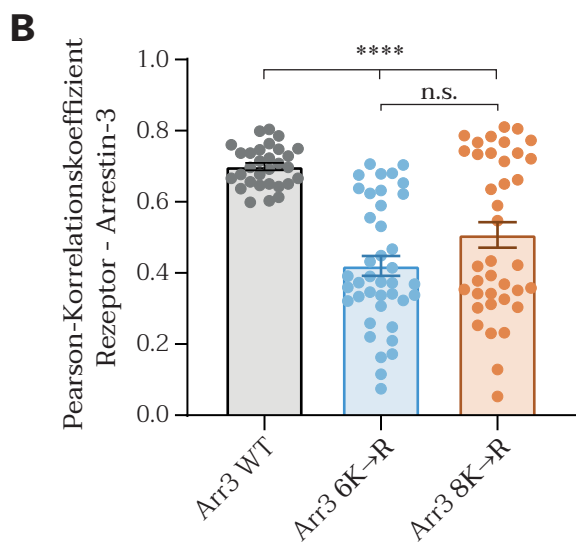
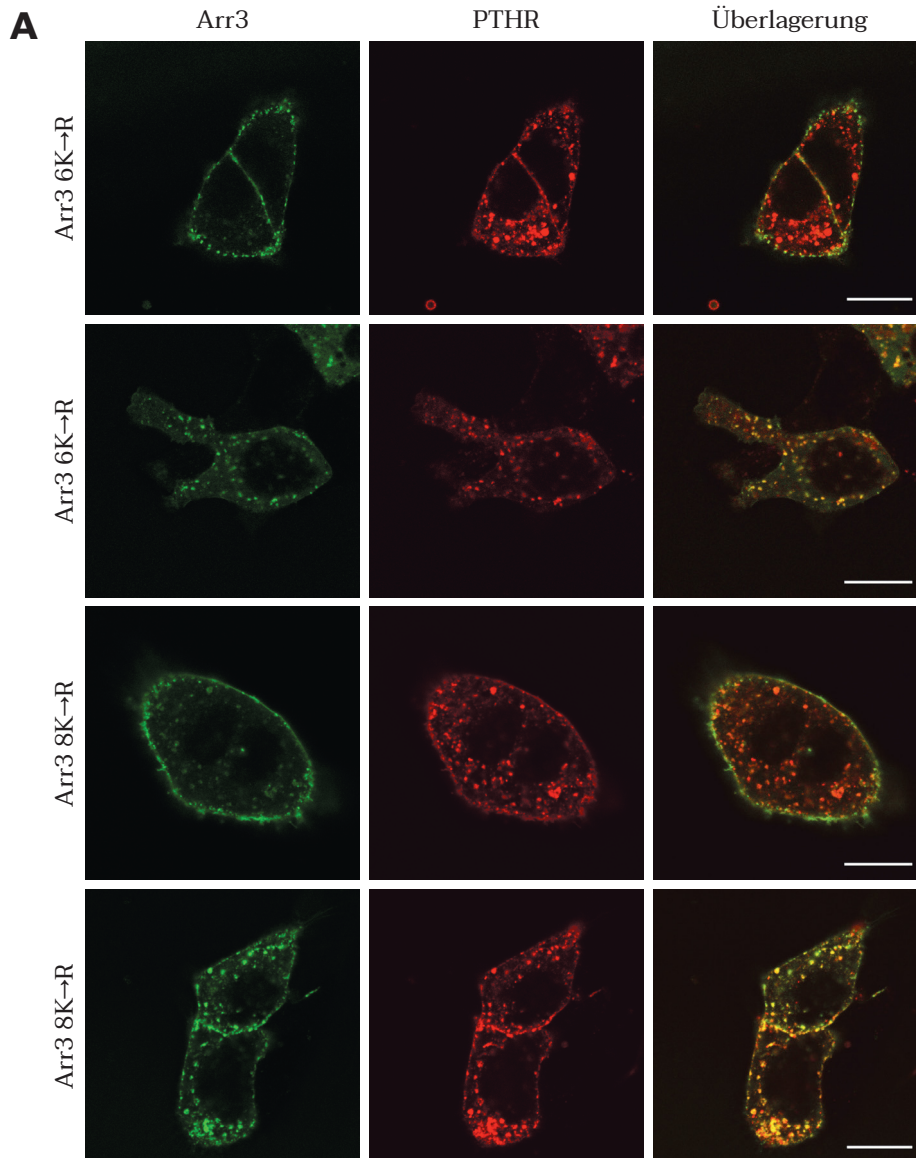


Abbildung 4.27 | Zelluläre Lokalisation von Arr3-Mehrfachmutanten nach Stimulation des PTHR

A Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ M PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Aufgrund des variablen Phänotyps der Mutanten sind jeweils zwei repräsentative Bilder mit unterschiedlichem Verhalten abgebildet. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

B Die Colokalisation von PTHR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Arr3 WT: n = 30; Arr3 6K→R: n = 40; Arr3 8K→R: n = 38 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****p < 0,0001, ns p \geq 0,05).

Da mit Arr3 6K→R leicht niedrigere Pearson-Korrelationseffizienten bestimmt wurden (Abb. 4.27, wenn auch nicht statistisch signifikant), wurde nur die Internalisierung dieser Arrestin-3-Mutante mit weiteren Klasse-B-Rezeptoren analysiert. Während Arr3 6K→R mit dem β_2 AR-SSS größtenteils keine Internalisierung und daher nur niedrige Colokalisationswerte aufwies (Abb. 4.28 A, beide Reihen), ergab sich mit dem β_2 V₂R erneut eine breite Streuung der Pearson-Korrelationskoeffizienten, da die Arrestin-3-Mutante in manchen Zellen, wie mit dem PTHR, in Endosomen lokalisiert war (Abb. 4.28 B, untere Reihe), wohingegen in anderen Zellen keine Internalisierung des Arrestins stattgefunden hatte (Abb. 4.28 B, obere Reihe).

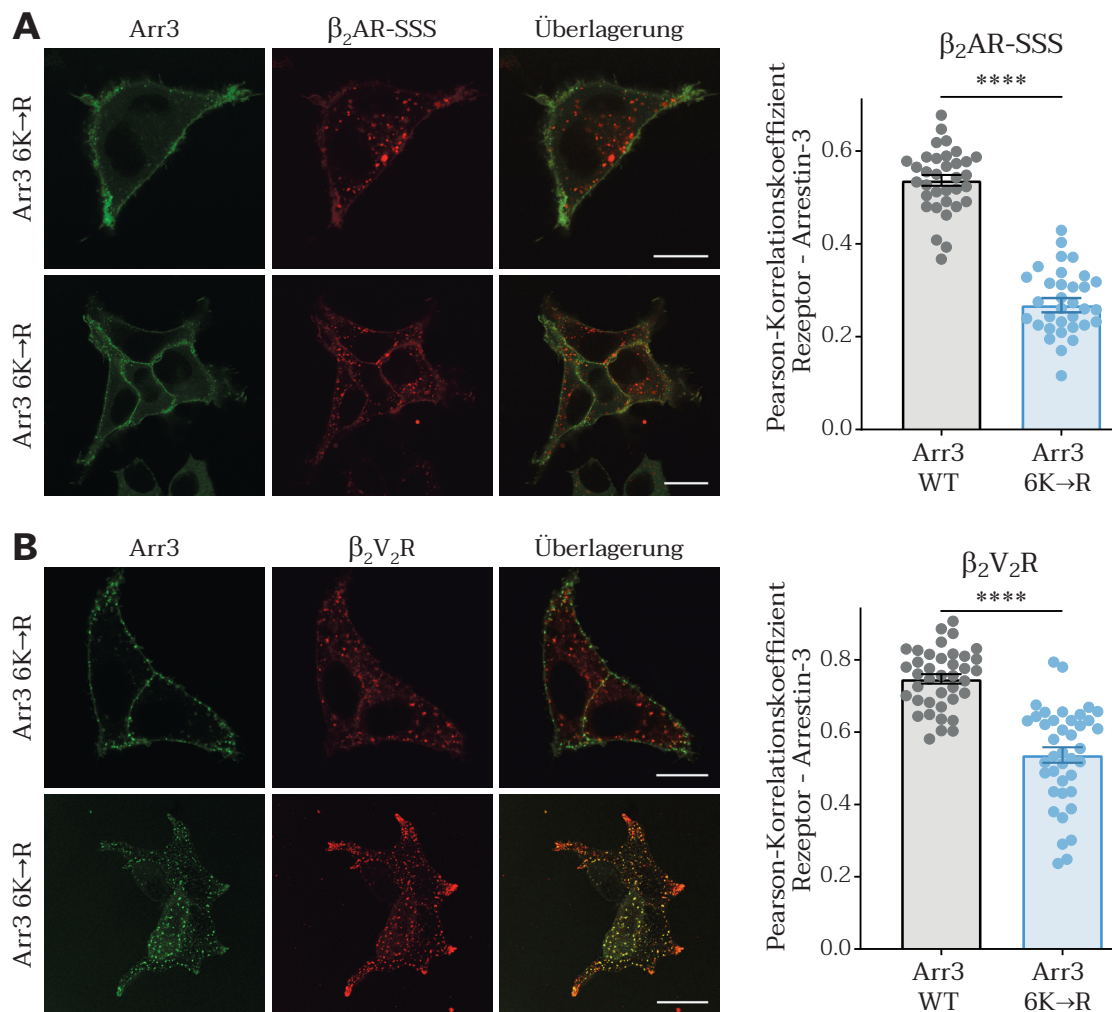


Abbildung 4.28 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Transient transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ M Isoprenalin stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m. Die Colokalisation von Rezeptoren und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurden einseitige t-Tests durchgeführt (**** p < 0,0001).

A Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation des β_2 AR-SSS (Arr3 WT: n = 34; Arr3 6K→R: n = 34 von drei unabhängigen Messtagen).

B Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation des β_2 V₂R (Arr3 WT: n = 39; Arr3 6K→R: n = 40 von drei unabhängigen Messtagen).

Außerdem wurde der endosomale Transport von Arr3 6K→R mit dem AT₁R und dem V₂R untersucht, wobei hierfür erneut nicht-fluoreszierende Wildtyp-Rezeptoren verwendet wurden und stattdessen die Colokalisation von Arrestin-3 mit dem endosomalen Marker EEA1 überprüft wurde (Abb. 4.29 A, B). Auffälligerweise wurde Arr3 6K→R nach Stimulation dieser beiden Klasse-B-Rezeptoren genauso wie Arr3 WT überwiegend in Endosomen internalisiert.

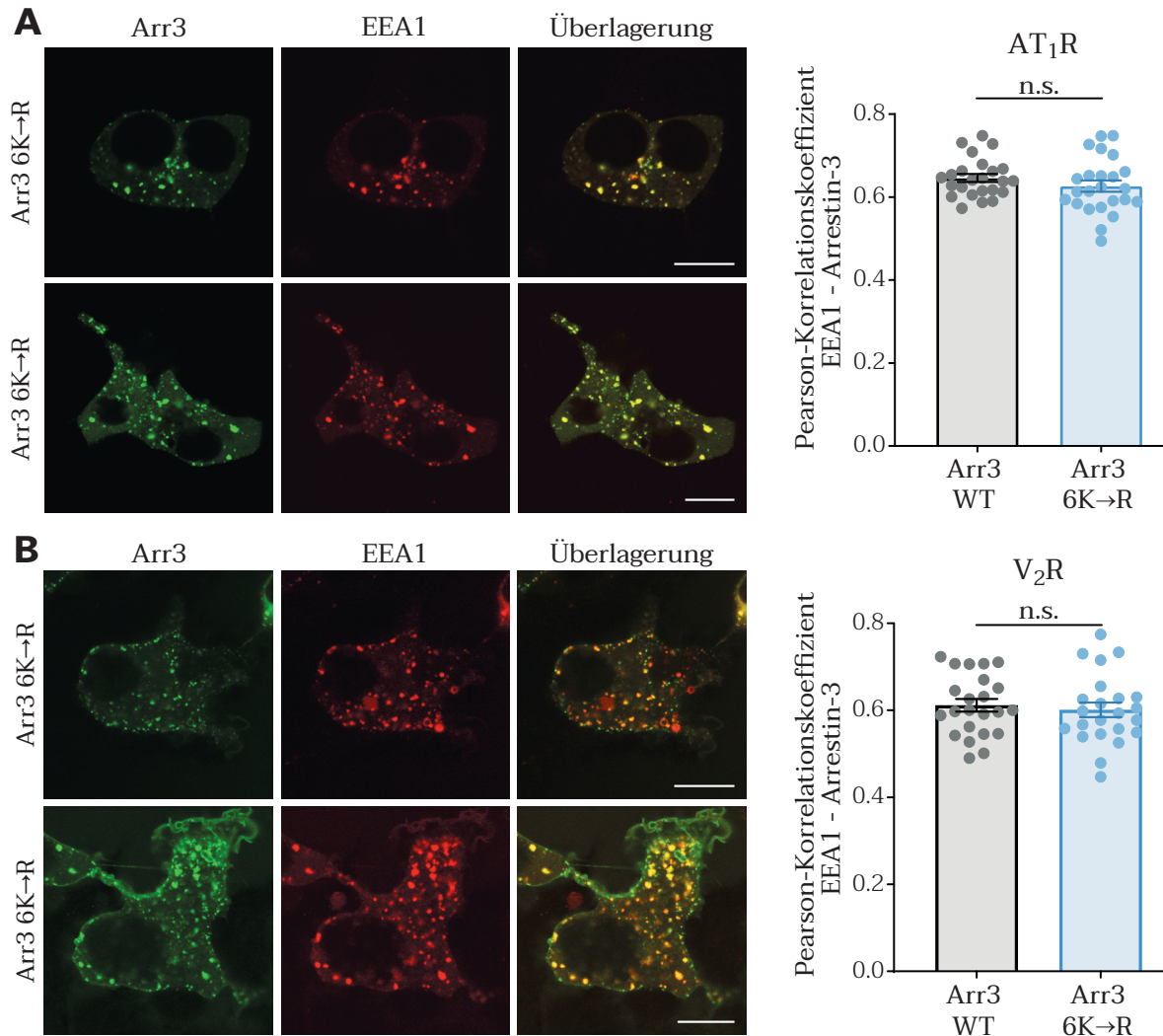


Abbildung 4.29 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Transient transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit Agonist stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 µm. Die Colokalisation von EEA1 und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurden einseitige t-Tests durchgeführt (****p < 0,0001, ns p ≥ 0,05).

A Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation des AT₁R mit 1 µM AT II (Arr3 WT: n = 24; Arr3 6K→R: n = 24 von drei unabhängigen Messtagen).

B Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation des V₂R mit 1 µM AVP (Arr3 WT: n = 23; Arr3 6K→R: n = 23 von drei unabhängigen Messtagen).

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass die Kombination aller Lysin-zu-Arginin-Mutationen, die als Einzelmutanten ein reduziertes Ubiquitinierungslevel zeigten, die Internalisierung von Arrestin-3 mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren zumindest in manchen Zellen verhindert. Es ist jedoch nicht klar, wodurch dieser variable Phänotyp ausgelöst wurde.

Untersuchung von Arr3 4K→R und Arr3 2K→R

Um zu prüfen, ob bereits eine geringere Anzahl an Mutationsstellen ausreicht, um die Internalisierung von Arrestin-3 mit Klasse-B-Rezeptoren zu beeinträchtigen, wurden zwei Arrestin-3-Mutanten, die als Zwischenprodukte des Klonierungsprozesses der Sechsfachmutante erstellt worden waren, ebenfalls getestet. Hierbei handelte es sich zum einen um die Kombination der beiden C-terminaleren Mutationen K308R und K397R (Arr3 2K→R), sowie zum anderen um die Vierfachmutante Arr3 4K→R mit den Mutationen K50R, K108R, K153R und K178R.

Wie in Abb. 4.30 dargestellt ist, interagierten auch diese beiden Arrestin-3-Varianten in FRET-Messungen mit dem β_2V_2R wie Wildtyp-Arrestin.

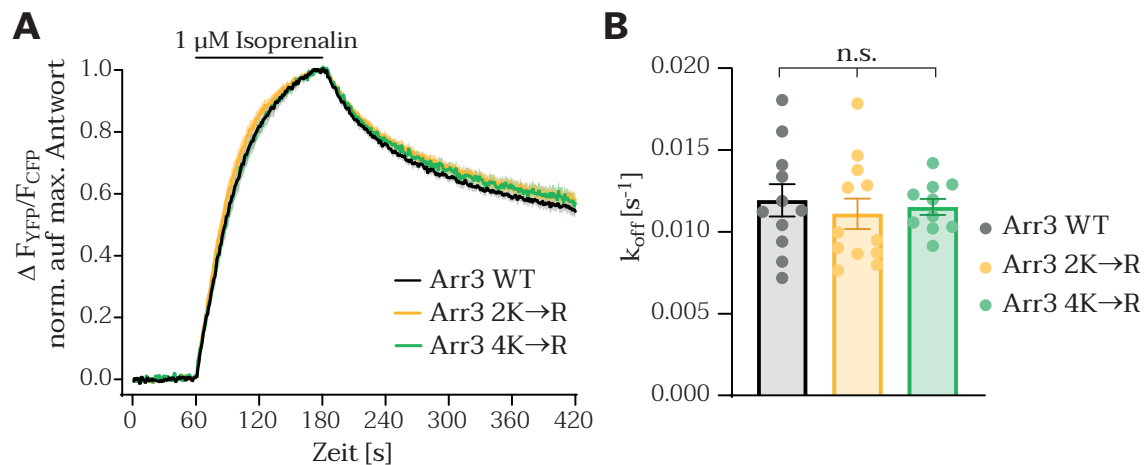


Abbildung 4.30 | Interaktion weiterer Arr3-Mehrfachmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen

A Die FRET-Messungen zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem β_2V_2R wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit 1 μM Isoprenalin perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die fünf letzten Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

B Die Auswaschkinetik jeder einzelnen Kurve wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung quantifiziert und die k_{off} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (Arr3 WT: $n = 11$; Arr3 2K→R: $n = 12$; Arr3 4K→R: $n = 10$ von zwei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt ($ns \geq 0,05$).

Nach 30-minütiger Stimulation des PTHR wurde Arr3 2K→R bis auf wenige Ausnahmen wieder mit dem Rezeptor in Endosomen transportiert, sodass sich in der Quantifizierung mittels Pearson-Korrelationskoeffizient erneut kein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Arrestin-3 mehr ergab (siehe Abb. 4.31 A, B). Im Gegensatz dazu zeigte Arr3 4K→R bis auf wenige Ausnahmen gar keine Internalisierung mit dem Klasse-B-Rezeptor. Obwohl in manchen Zellen eine Internalisierung der beiden fluoreszenzmarkierten Arrestine beobachtet werden konnte (Abb. 4.31 A, untere Reihe), waren die daraus ermittelten Pearson-Korrelationskoeffizienten signifikant niedriger als für Arr3 WT und zeigten im Vergleich zu Arr3 6K→R deutlich weniger Streuung.

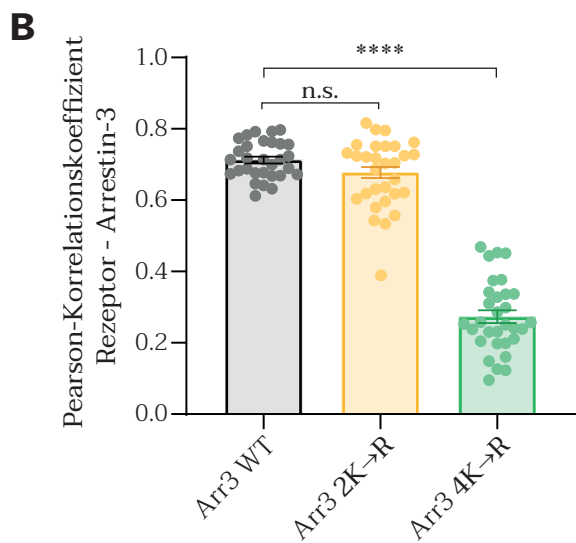
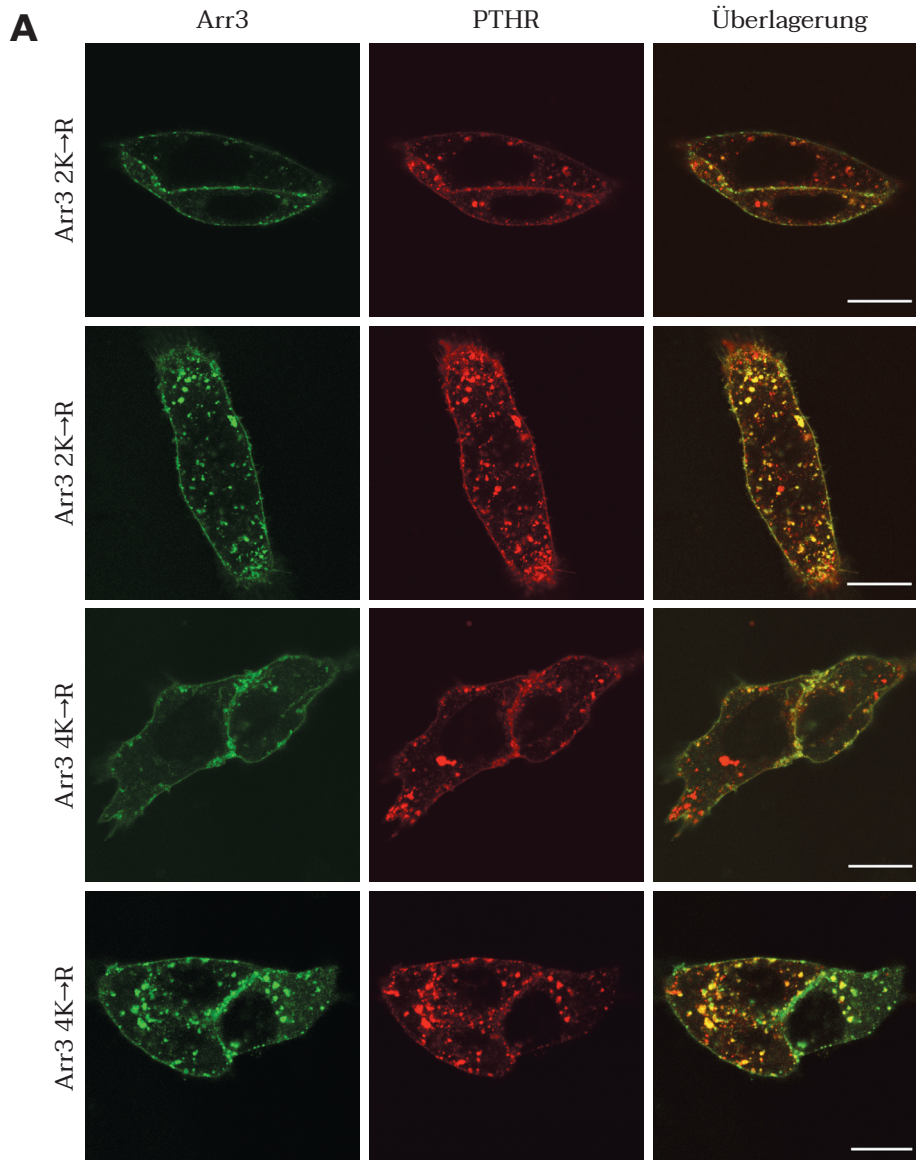


Abbildung 4.31 | Zelluläre Lokalisation weiterer Arr3-Mehrfachmutanten nach Stimulation des PTHR

A Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ M PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

B Die Colokalisation von PTHR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Arr3 WT: n = 30; Arr3 2K→R: n = 30; Arr3 4K→R: n = 31 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****p < 0,0001, ns p \geq 0,05).

Da Arr3 4K→R mit dem PTHR ein recht einheitliches Verhalten zeigte und das Arrestin durch die Einführung der vier Lysin-zu-Arginin-Mutationen nicht mehr mit diesem Rezeptor internalisieren konnte, wurde ebenfalls überprüft, ob sich dieses Verhalten auch auf weitere Klasse-B-Rezeptoren übertragen ließ. Bemerkenswerterweise ergab sich hier jedoch mit dem β_2 AR-SSS (Abb. 4.32 A) ein extrem breit streuender Phänotyp mit Zellen, in denen die Arr3 4K→R einen dem Wildtyp entsprechenden endosomalen Transport zeigte (Abb. 4.32 A, untere Reihe) und gleichzeitig anderen Zellen, in denen Arr3 4K→R nicht mit dem Rezeptor internalisiert worden war (Abb. 4.32 A, obere Reihe). Dies ist auch anhand der stark streuenden Pearson-Korrelationskoeffizienten ersichtlich. Mit dem β_2 V₂R verhielt sich die Arrestin-3-Mutante jedoch ähnlich zum PTHR und verlor größtenteils die Fähigkeit, in intrazelluläre Kompartimente zu internalisieren (Abb. 4.32 B).

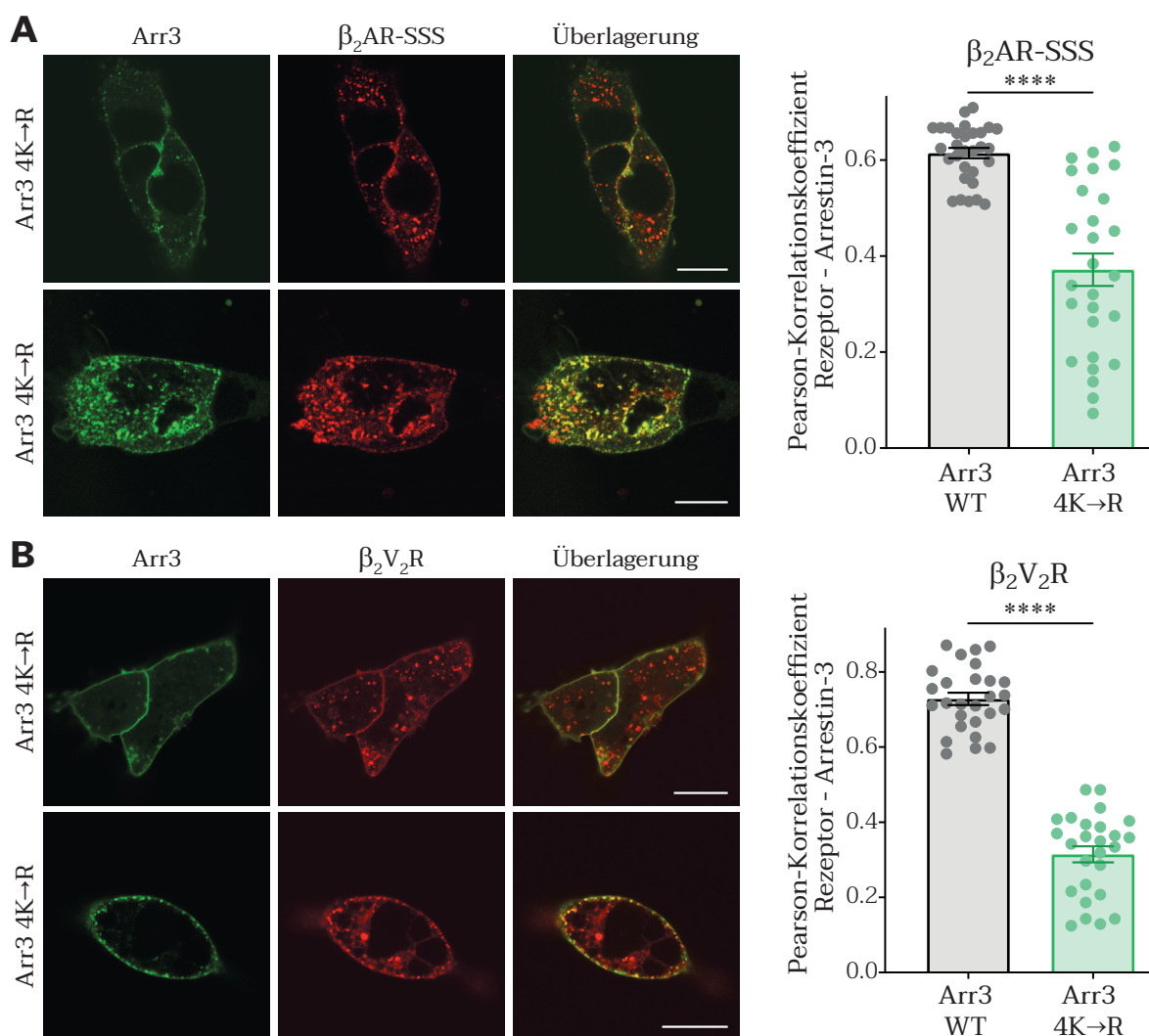


Abbildung 4.32 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Transient transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ M Isoprenalin stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m. Die Colokalisation von Rezeptoren und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurden einseitige t-Tests durchgeführt (****p < 0,0001).

A Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation des β_2 AR-SSS (Arr3 WT: n = 30; Arr3 4K→R: n = 27 von drei unabhängigen Messtagen).

B Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation des β_2 V₂R (Arr3 WT: n = 27; 4K→R: n = 26 von drei unabhängigen Messtagen).

Mit den Rezeptoren AT_1R und V_2R zeigte sich im Vergleich zur Sechsfachmutante mit Arr3 4K→R eine breitere Streuung der Pearson-Korrelationskoeffizienten für die Colokalisation der Arrestine und EEA1, was sich auch in den Aufnahmen einzelner Zellen widerspiegelte, wo Arr3 4K→R nicht in allen Fällen in die durch den endosomalen Marker EEA1 kenntlich gemachten Endosomen aufgenommen wurde.

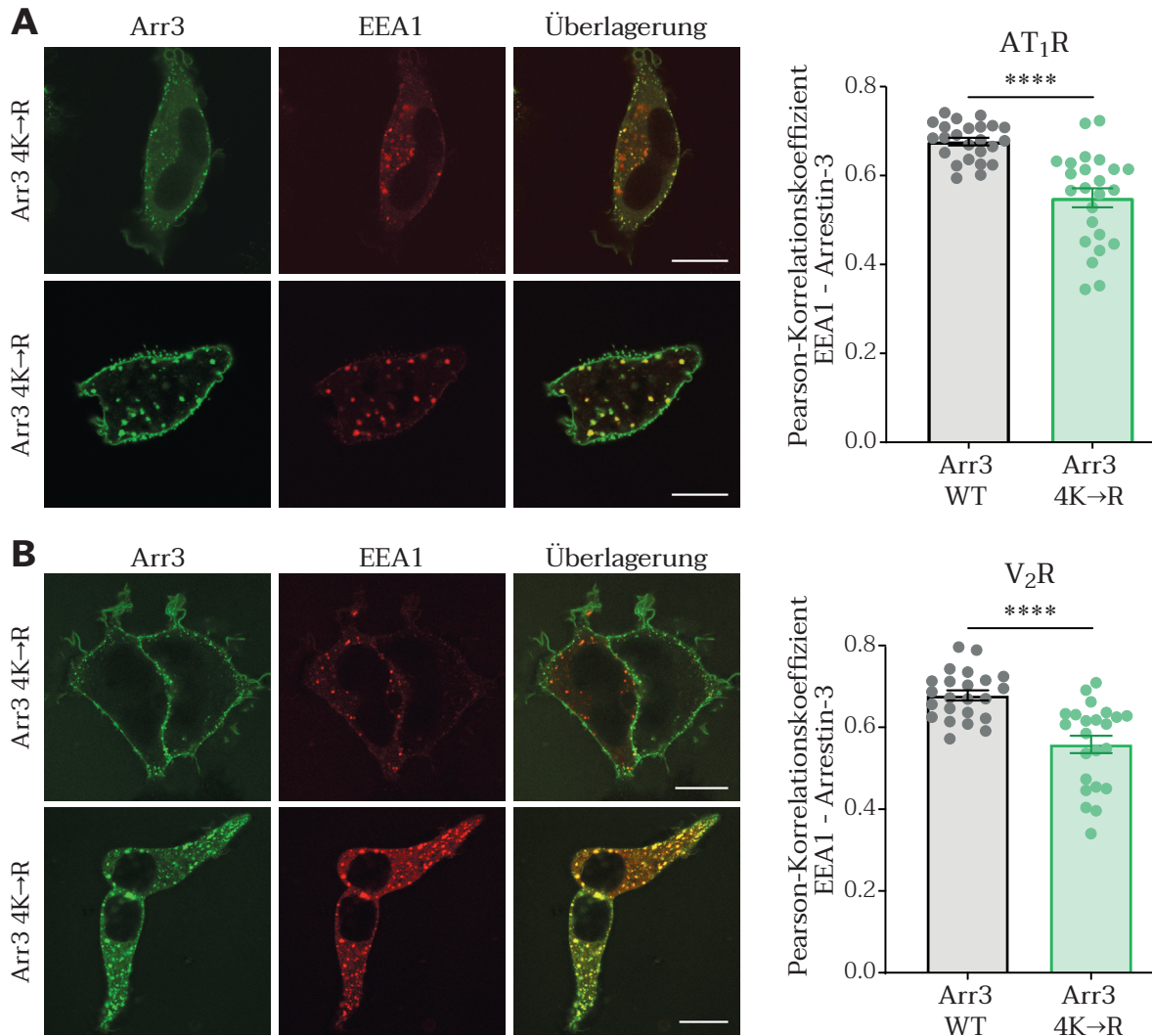


Abbildung 4.33 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Transient transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit Agonist stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 µm. Die Colokalisation von Rezeptoren bzw. EEA1 und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurden einseitige t-Tests durchgeführt (**** $p < 0,0001$, ns $p \geq 0,05$).

A Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation des AT_1R mit 1 µM AT II (Arr3 WT: $n = 24$; Arr3 6K→R: $n = 24$ von drei unabhängigen Messtagen).

B Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation des V_2R mit 1 µM AVP (Arr3 WT: $n = 24$; Arr3 6K→R: $n = 24$ von drei unabhängigen Messtagen).

Insgesamt wurde durch die Kombination von nur vier Mutationen die Fähigkeit von Arrestin-3, mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren zu internalisieren, stärker eingeschränkt als mit Arr3 6K→R, da die beiden Lysine 308 und 397 offenbar keinen Einfluss auf die Internalisierung des Arrestins hatten (siehe Arr3 2K→R, Abb. 4.31).

Da einige der erstellten Arrestin-3-Mehrfachmutanten eine reduzierte Internalisierung mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren aufwiesen, wurde mittels Zwei-Farben-FRAP untersucht, ob dieses Verhalten mit einer niedrigeren Stabilität der Arrestin-Rezeptor-Komplexe im Zusammenhang steht. Für diese Experimente wurde ein N-terminal mit YFP markierter β_2 AR-SSS verwendet, da dieser in FRAP-Messungen schon mehrfach erfolgreich eingesetzt worden war (Zindel *et al.*, 2015). Da die Komplexe dieses Rezeptors mit Arrestin-3 weniger stabil sind als mit anderen Klasse-B-Rezeptoren, wie z.B. dem PTHR oder dem β_2 V₂R (siehe Abb. 4.1), wurde vermutet, dass Affinitätsänderungen von Arrestin-3 so leichter erkannt werden können. In den Kolo-kalisations-Experimenten (Abb. 4.32 A und 4.28 A) konnte außerdem für Arr3 4K→R und Arr3 6K→R nachgewiesen werden, dass diese Mutanten nur noch eingeschränkt zusammen mit dem β_2 AR-SSS internalisierten.

In Abb. 4.34 A ist gezeigt, dass sich das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Fluoreszenzwiederkehr von Wildtyp-Arrestin-3 (links) deutlich von der des Rezeptors (rechts) unterschieden, sodass vermutlich ein Austausch der Arrestine am β_2 AR-SSS stattgefunden hatte, im Gegensatz zu Experimenten mit dem β_2 V₂R (vgl. Kap. 4.1, Abb. 4.1). Während die Fluoreszenzwiederkehr der Rezeptoren in allen Konditionen nicht über 40 % der Intensität vor dem Bleichprozess hinausging, kehrte die Fluoreszenzintensität von Wildtyp-Arrestin schnell auf ca. 70 % der Ausgangsintensität zurück. Jedoch unterschieden sich die Kurven der fluoreszierenden Arrestin-3-Mutanten (Arr3 6K→R, Arr3 4K→R und Arr3 2K→R) nicht von Arr3 WT, was durch die Auswertung der Kinetik durch monoexponentielle Kurvenanpassung der Einzelmessungen quantifiziert wurde, in der sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ließ (Abb. 4.34 B). Diese Arrestin-3-Mehrfachmutanten bildeten also keine instabilen Komplexe mit dem aktivierten β_2 AR-SSS als Wildtyp-Arrestin, obwohl sie kaum mit dem Rezeptor in Endosomen internalisiert wurden (siehe Abb. 4.32, Abb. 4.28).

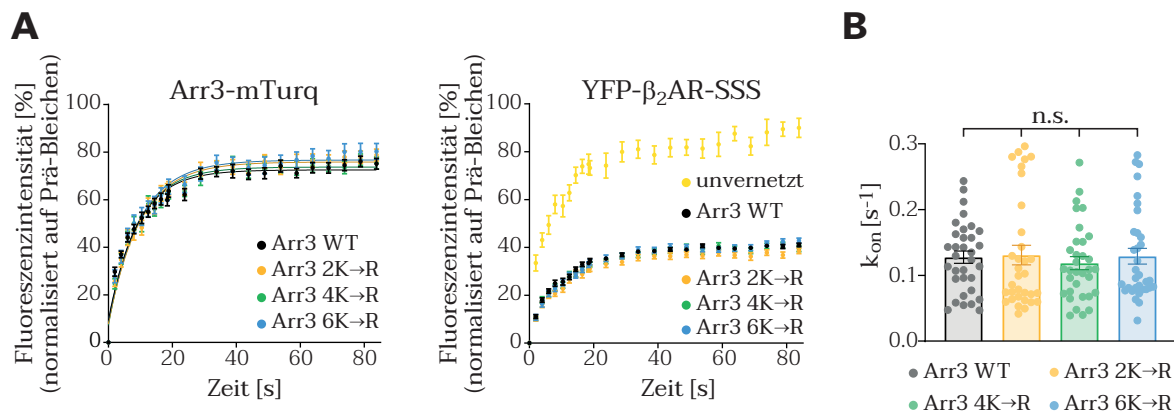


Abbildung 4.34 | Bestimmung der Affinität der Arr3-Mehrfachmutanten zum β_2 AR-SSS mittels FRAP

A Die FRAP-Messungen wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.5.3 beschrieben. Die Rezeptoren wurden für 15 min bei 37 °C bzw. Raumtemperatur (unvernetzte Rezeptoren) mit 10 μ M Isoprenalin stimuliert und die Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen anschließend simultan für mTurq-markiertes Arr3 und YFP-markierte Rezeptoren aufgenommen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM (Arr3 WT: n = 33; Arr3 6K→R: n = 33; Arr3 4K→R: n = 33; Arr3 2K→R: n = 33; unvernetzt: n = 32; von sechs unabhängigen Messtagen). Die eingezeichneten Kurven wurden durch einen monoexponentiellen Kurvenfit der Mittelwerte erhalten.

B Die Kinetik der Fluoreszenzwiederkehr von Arr3-mTurq wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung jeder einzelnen Kurve quantifiziert und die k_{on} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen. Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $p \geq 0,05$).

Untersuchung von Arr3-Dreifachmutanten

Da die Arrestin-3-Mutante 4K→R (mit den Mutationen K50R, K108R, K153R und K178R) mit manchen Klasse-B-Rezeptoren nach wie vor internalisieren konnte, wurde die Anzahl der Mutationen erneut reduziert. Ausgehend von Arr3 4K→R wurden vier neue Mutanten erstellt, die jeweils drei der vier Lysin-zu-Arginin-Mutationen trugen. So entstanden Arr3 K108R K153R K178R, Arr3 K50R K153R K178R, Arr3 K50R K108R K178R und K50R K108R K153R.

Diese Arrestin-3-Mutanten verhielten sich in FRET-Messungen mit dem β_2V_2R genauso wie Arr3 WT (Abb. 4.35 A, B).

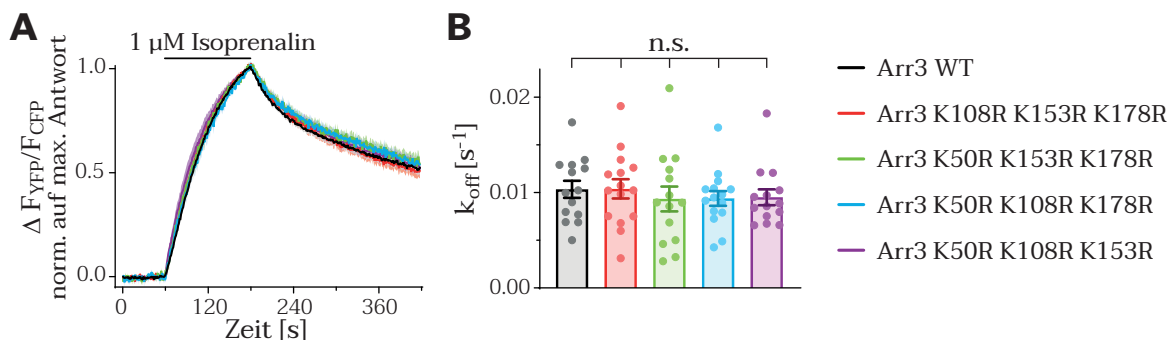


Abbildung 4.35 | Interaktion der Arr3-Dreifachmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen

A Die FRET-Messungen zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem β_2V_2R wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit 1 μ M Isoprenalin perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die fünf letzten Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

B Die Auswaschkinetik jeder einzelnen Kurve wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung quantifiziert und die k_{off} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (Arr3 WT: n = 14; Arr3 K108R K153R K178R: n = 15; Arr3 K50R K153R K178R: n = 14; Arr3 K50R K108R K178R: n = 14; Arr3 K50R K108R K153R: n = 14 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns p \geq 0,05).

Um die Internalisierung dieser Mutanten zu analysieren, wurde erneut der PTHR ausgewählt. Wie in Abb. 4.36 A zu sehen ist, internalisierten nur zwei der vier Arrestin-3-Varianten zusammen mit dem Rezeptor in Endosomen (Arr3 K108R K153R K178R und Arr3 K50R K108R K178R). Die Quantifizierung der Colokalisation zeigt ebenfalls, dass diese beiden Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Arrestin deutlich reduzierte Pearson-Korrelationskoeffizienten aufwiesen (Abb. 4.36 B). Da der statistische Unterschied der anderen Mutanten zu Arr3 WT kleiner ausfiel, wurden die weiteren Experimente auf Basis der beiden Dreifachmutanten geplant, die eine deutlich eingeschränkte Internalisierung mit dem PTHR demonstrierten, also Arr3 K108R K153R K178R und Arr3 K50R K108R K178R.

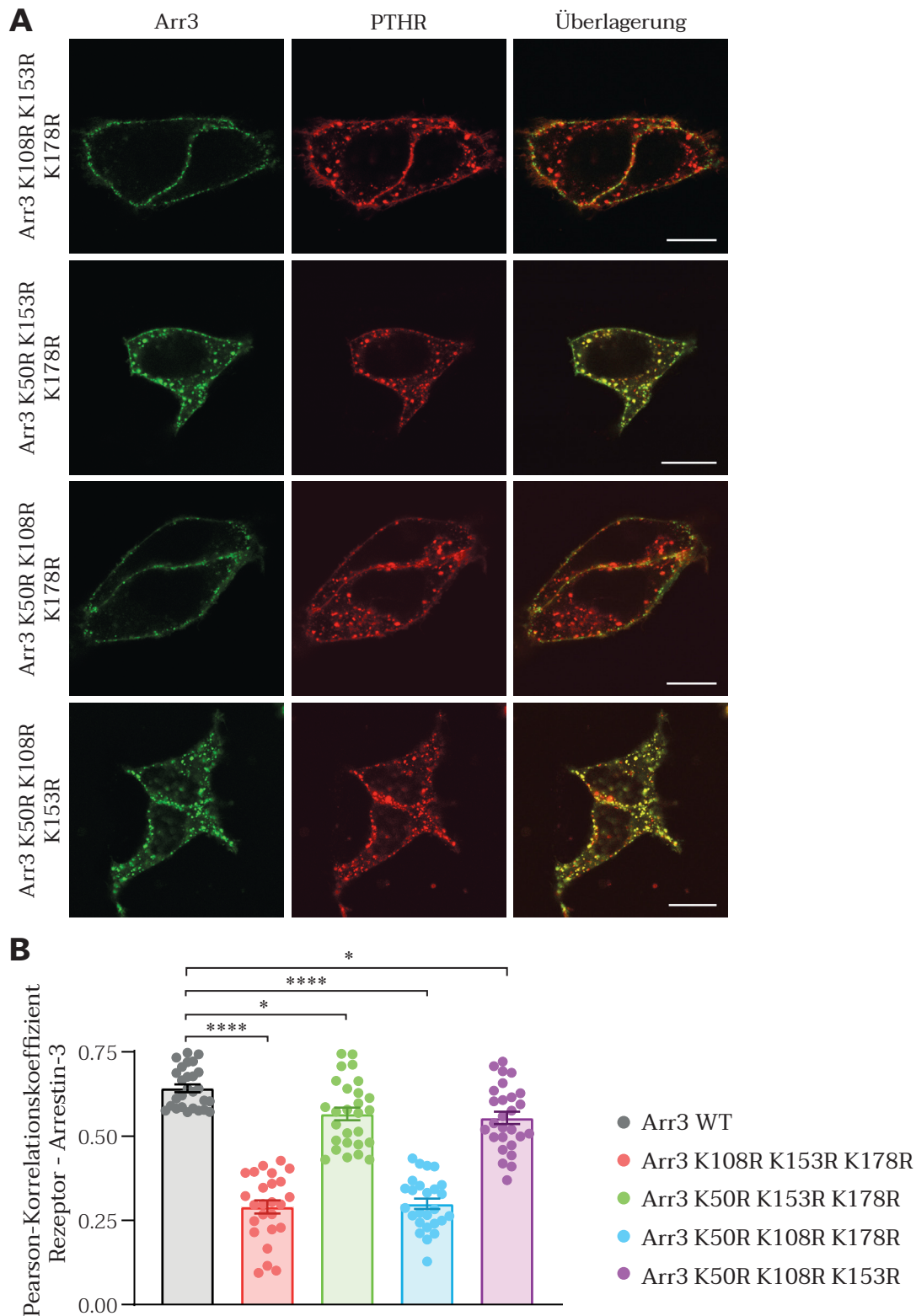


Abbildung 4.36 | Zelluläre Lokalisation der Arr3-Dreifachmutanten nach Stimulation des PTHR

A Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37°C mit 1 μ M PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

B Die Colokalisation von PTHR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Arr3 WT: n = 27; Arr3 K108R K153R K178R: n = 25; Arr3 K50R K153R K178R: n = 27; Arr3 K50R K108R K178R: n = 26; Arr3 K50R K108R K153R: n = 27 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****p < 0,0001, *p < 0,05).

Untersuchung von weiteren Arr3-Doppelmutanten

Die beiden eben beschriebenen Arrestin-3-Dreifachmutanten hatten zwei der jeweils drei Lysin-zu-Arginin-Mutationen gemeinsam, nämlich an den Positionen 108 und 178, sodass im nächsten Schritt eine Arrestin-3-Mutante mit nur diesen beiden Mutationen erstellt wurde. Die beiden übrigen Mutationen wurden in einer weiteren Mutante kombiniert, sodass zwei neue Arrestin-3-Varianten entstanden: Arr3 K108R K178R sowie Arr3 K50R K153R.

Zunächst wurde erneut kontrolliert, dass beide Mutanten in FRET-Messungen eine agonist-abhängige Interaktion mit dem β_2V_2R aufwiesen, was in Abb. 4.37 belegt ist. Die beiden Doppelmutanten zeigten ebenfalls keinen Unterschied zu Wildtyp-Arrestin in der Auswaschkinetik.

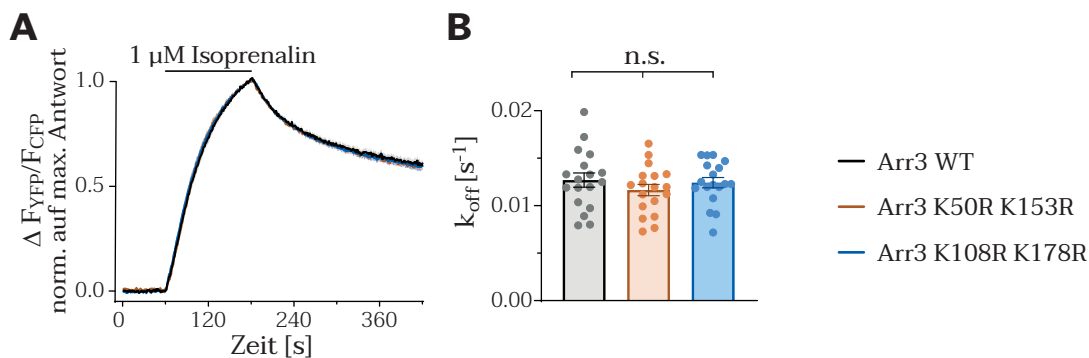


Abbildung 4.37 | Interaktion der Arr3-Doppelmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen

A Die FRET-Messungen zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem β_2V_2R wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit 1 μM Isoprenalin perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die fünf letzten Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

B Die Auswaschkinetik jeder einzelnen Kurve wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung quantifiziert und die k_{off} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (Arr3 WT: $n = 18$; Arr3 K50R K153R: $n = 18$; Arr3 K108R K178R: $n = 18$ von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt ($ns p \geq 0,05$).

Bei der Untersuchung der Internalisierung der beiden Arrestin-3-Mutanten zeigte sich, dass Arr3 K108R K178R in den meisten Zellen tatsächlich nicht mehr in der Lage war, mit dem PTHR in endosomale Kompartimente transportiert zu werden und sich daher hauptsächlich an der Zellmembran befand (Abb. 4.38 A). Im Gegensatz dazu zeigte Arr3 K50R K153R eine dem Wildtyp entsprechende intrazelluläre Lokalisation, was auch durch die Quantifizierung der Colokalisation von Arrestin-3 und Rezeptor bestätigt wurde, wo sich nur Arr3 K108R K178R signifikant von Arr3 WT unterschied (Abb. 4.38 B).

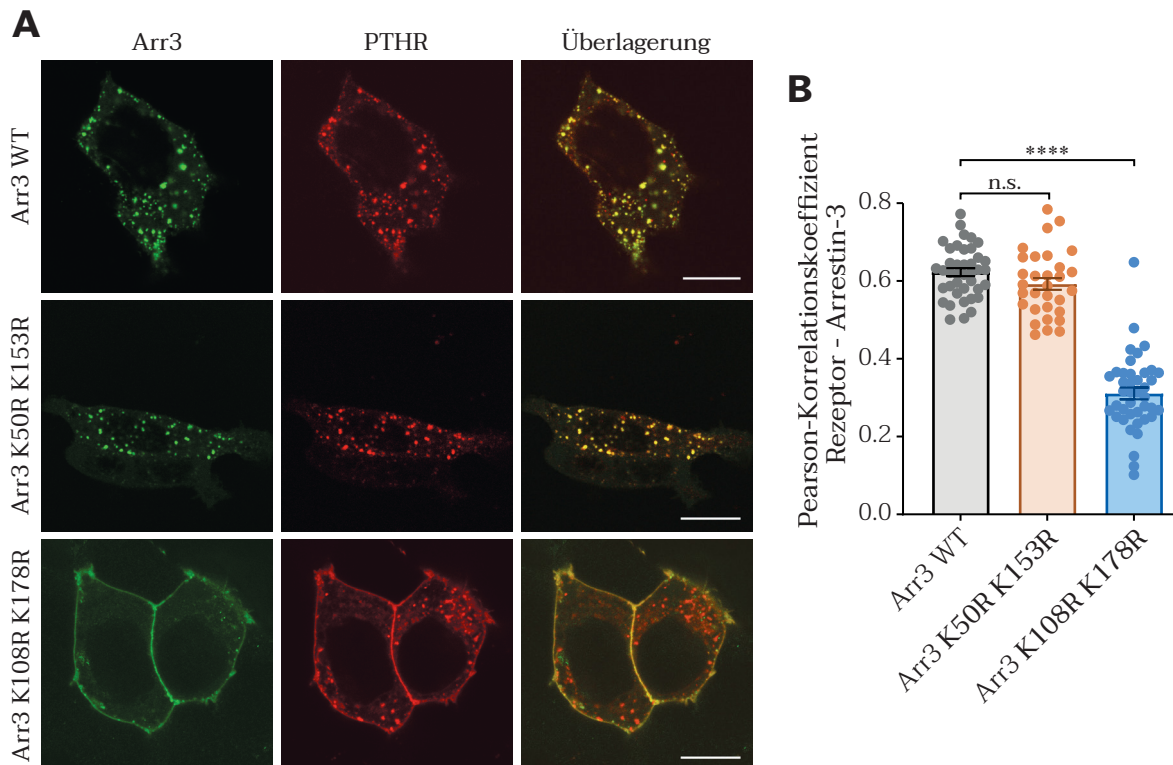


Abbildung 4.38 | Zelluläre Lokalisation der Arr3-Doppelmutanten nach Stimulation des PTHR

A Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ M PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

B Die Colokalisation von PTHR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Arr3 WT: n = 40; Arr3 K108R K178R: n = 41; Arr3 K50R K153R: n = 32 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (****p < 0,0001, ns p \geq 0,05).

Um zu untersuchen, ob die Mutante Arr3 K108R K178R auch mit anderen Rezeptoren nur noch eingeschränkt in Endosomen transportiert wird, wurde konfokalmikroskopisch die Lokalisation des Arrestins nach der Stimulation weiterer Klasse-B-Rezeptoren analysiert. Wie in Abb. 4.39 zu sehen ist, wies Arr3 K108R K178R sowohl mit dem β_2 AR-SSS (Abb. 4.39 A) als auch dem β_2 V₂R (Abb. 4.39 B) erneut einen sehr variablen Phänotyp auf und internalisierte zwar in manchen Zellen mit dem Rezeptor in die Zelle, verblieb in anderen jedoch an der Zellmembran. Bei diesen Experimenten konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die Zellen unterschiedlich behandelt wurden, da sich Zellen beider Fraktionen auf demselben Deckgläschen befanden. Trotz der breit streuenden Korrelationskoeffizienten, die zur Quantifizierung der Colokalisation zwischen Rezeptoren und Arrestin berechnet wurden, ergab sich für beide Rezeptoren ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen Arr3 WT und Arr3 K108R K178R. Mit dem AT₁R (Abb. 4.39 C) und V₂R (Abb. 4.39 D) konnte hingegen gar keine Internalisierung der Arrestin-3-Doppelmutante beobachtet werden, was auch anhand der weniger breiten Streuung der Pearson-Korrelationskoeffizienten zu sehen ist.

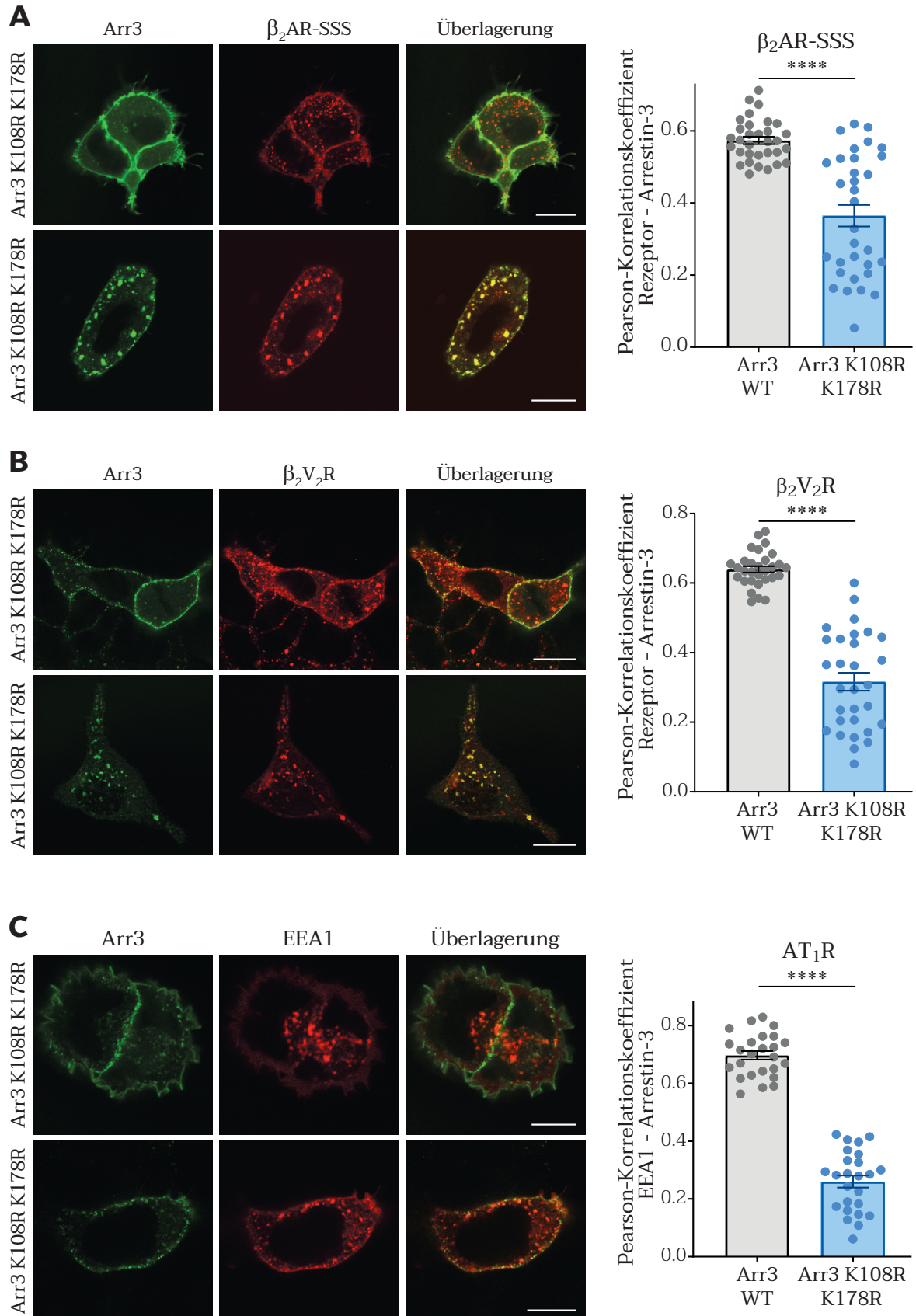


Abbildung 4.39 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

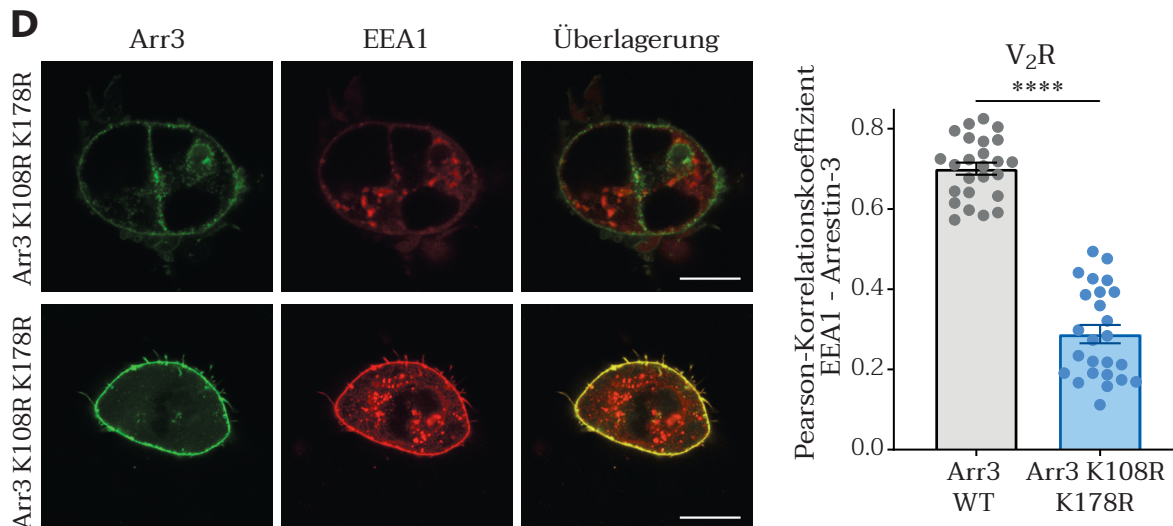


Abbildung 4.39 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Transient transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit Agonist stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 µm. Die Colokalisation von Rezeptoren bzw. EEA1 und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurden einseitige t-Tests durchgeführt (****p < 0,0001).

A Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation des β_2 AR-SSS mit 1 µM Isoprenalin (Arr3 WT: n = 32; Arr3 K108R K178R: n = 32 von drei unabhängigen Messtagen).

B Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation des β_2 V₂R mit 1 µM Isoprenalin (Arr3 WT: n = 30; Arr3 K108R K178R: n = 30 von drei unabhängigen Messtagen).

C Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation des AT₁R mit 1 µM AT II (Arr3 WT: n = 25; Arr3 K108R K178R: n = 25 von drei unabhängigen Messtagen).

D Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation des V₂R mit 1 µM AVP (Arr3 WT: n = 25; Arr3 K108R K178R: n = 25 von drei unabhängigen Messtagen).

Da Arr3 K108R K178R von allen bisher getesteten Arrestin-3-Mutanten bisher den stärksten Effekt auf die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren zeigte, wurde die Lokalisation der Mutante zusätzlich mit zwei weiteren Klasse-B-Rezeptoren analysiert. In Abb. 4.40 wurden hierfür der Neurotensin-Rezeptor des Typs 1 (NTSR1) und der Prostaglandin-E-Rezeptor vom Subtyp EP4 untersucht, wobei für den NTSR1 ein rot fluoreszenzmarkierter Rezeptor verwendet wurde, wohingegen die Internalisierung mit einem nichtleuchtenden EP4 anhand der Colokalisation des Arrestins mit rot fluoreszierendem EEA1 ausgewertet wurde. Wie in Abb. 4.40 A (NTSR1) und B (EP4) dargestellt ist, war Arr3 WT nach der Stimulation beider Rezeptoren in endosomalen Kompartimenten lokalisiert, was bestätigte, dass beide Rezeptoren zur Klasse B gehören. Arr3 K108R K178R wurde jedoch auch mit diesen Rezeptoren nicht mehr internalisiert, was sich auch in deutlich niedrigeren Pearson-Korrelationskoeffizienten widerspiegelte.

Die gleichzeitige Einführung der Lysin-zu-Arginin-Mutationen an den Positionen 108 und 178 resultierte also mit mehreren Klasse-B-Rezeptoren in einer deutlichen Beeinträchtigung der Co-Internalisierung des Arrestins in Endosomen.

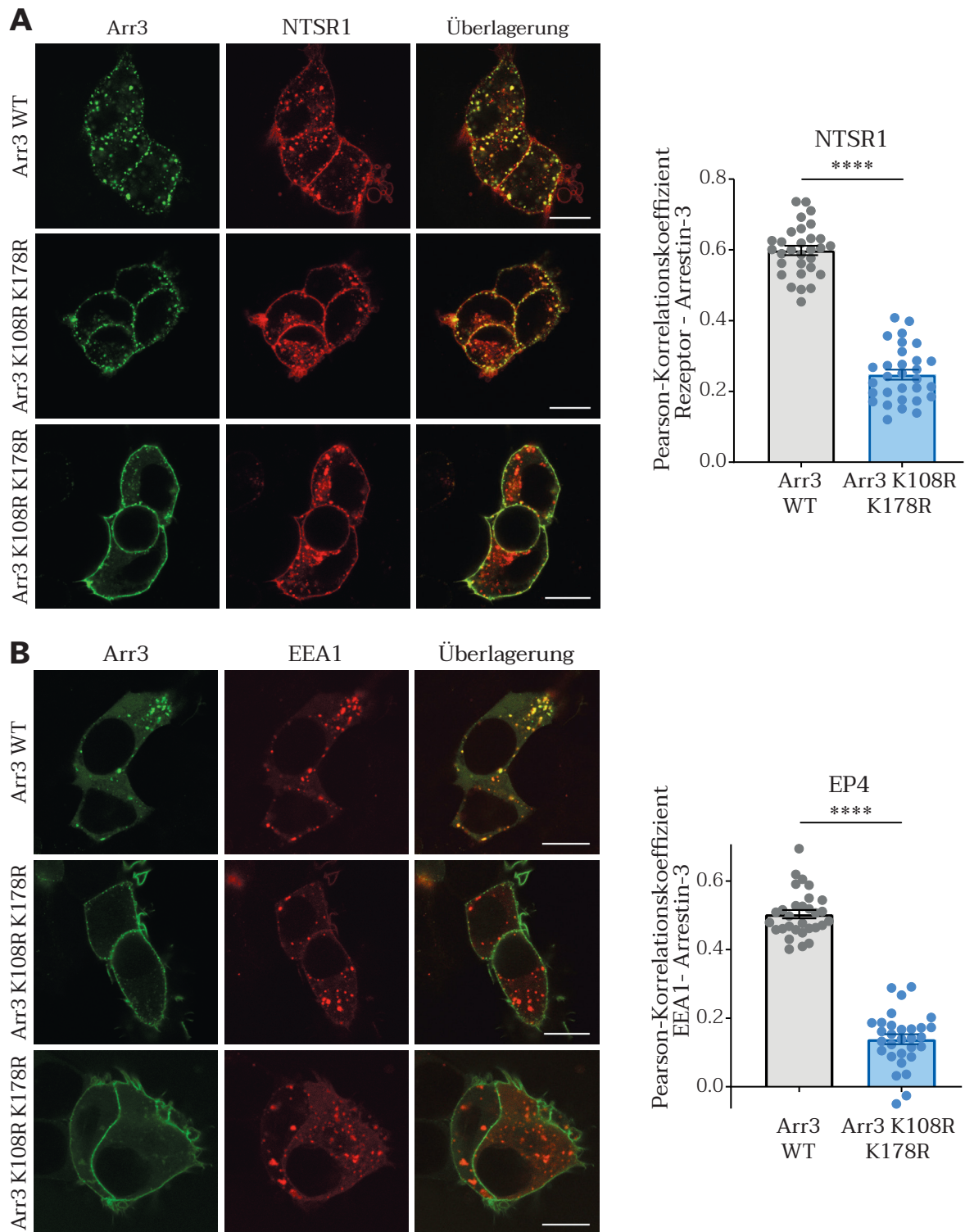


Abbildung 4.40 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation verschiedener Rezeptoren

Transient transfizierte Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit Agonist stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 µm. Die Colokalisation von Rezeptoren bzw. EEA1 und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurden einseitige t-Tests durchgeführt (****p < 0,0001).

A Lokalisation von Arr3 WT und Arr3 K108R K178R nach Stimulation des NTSR1 mit 500 nM NTS (Arr3 WT: n = 32; Arr3 K108R K178R: n = 32 von drei unabhängigen Messtagen).

B Lokalisation von Arr3 WT und Arr3 K108R K178R nach Stimulation des EP4 mit 5 µM PGE₂ (Arr3 WT: n = 30; Arr3 K108R K178R: n = 30 von drei unabhängigen Messtagen).

Da mit der Arrestin-3-Doppelmutante Arr3 K108R K178R der bisher eindeutigste Phänotyp bezüglich der Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren festgestellt wurde, wurde noch einmal überprüft, ob die beiden eingefügten Mutationen die Stabilität der Arrestin-Rezeptor-Komplexe reduzieren und deshalb auch zu einer verminderten Internalisierung solcher Komplexe in Endosomen führen. Hierfür wurden erneut FRAP-Experimente mit dem β_2 AR-SSS durchgeführt, in denen die neuen beiden Doppelmutanten mit Wildtyp-Arrestin verglichen wurden.

In Abb. 4.41 A ist die Wiederkehr der fluoreszierenden Proteine dargestellt. Die Fluoreszenz der Arrestin-3-Doppelmutanten Arr3 K50R K153R und Arr3 K108R K178R kehrte mit gleicher Geschwindigkeit und im gleichen Ausmaß wie Wildtyp-Arrestin zurück (links). Dies wird durch die Quantifizierung der Kinetik jeder einzelnen Messung durch monoexponentielle Kurvenfits bestätigt, wo sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Arrestinen ergaben (Abb. 4.41 B). Daraus lässt sich ableiten, dass alle Arrestin-3-Varianten eine ähnliche Affinität zum β_2 AR-SSS aufwiesen und somit ähnlich stabile Komplexe mit dem Rezeptor bildeten. Die Kontrolle der Fluoreszenzwiederkehr der Rezeptoren zeigte wie gewünscht ebenfalls keinen Unterschied zwischen den einzelnen Konditionen (Abb. 4.41 A, rechts).

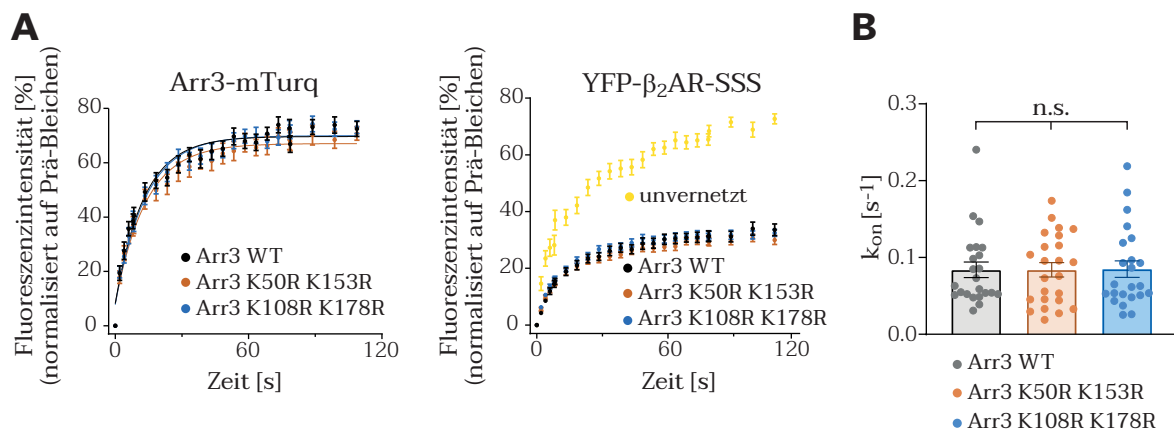


Abbildung 4.41 | Bestimmung der Affinität der Arr3-Doppelmutanten zum β_2 AR-SSS mittels FRAP

A Die FRAP-Messungen wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.5.3 beschrieben. Die Rezeptoren wurden für 15 min bei 37 °C bzw. Raumtemperatur (unvernetzte Rezeptoren) mit 10 μ M Isoprenalin stimuliert und anschließend die Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen simultan für mTurq-markiertes Arr3 und YFP-markierte Rezeptoren aufgenommen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM (Arr3 WT: n = 23; Arr3 K50R K153R: n = 23; Arr3 K108R K178R: n = 24 von sechs unabhängigen Messtagen). Die eingezeichneten Kurven wurden durch einen monoexponentiellen Kurvenfit der Mittelwerte erhalten.

B Die Kinetik der Fluoreszenzwiederkehr von Arr3-mTurq wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung jeder einzelnen Kurve quantifiziert und die k_{on} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen. Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $p \geq 0,05$).

Da alle Lysin-zu-Arginin-Mutanten von Arrestin-3 auf Grundlage der Hypothese erstellt wurden, dass eine starke und dauerhafte Ubiquitinierung des Arrestins für die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren erforderlich ist, stellte sich nun die Frage, wie stark diese Arrestin-3-Mutante nach Stimulation eines solchen Rezeptors noch ubiquitiniert wird. Hierfür wurden, wie bereits beschrieben, FLAG-markierte Arrestine nach 60-minütiger Stimulation des PTHR präzipitiert und die Ubiquitinierungslevel der Doppelmutanten mittels Western Blot mit dem von Wildtyp-Arrestin verglichen. Der repräsentative Western Blot in Abb. 4.42 A dokumentiert, dass im Vergleich zu Arr3 WT sowohl Arr3 K108R K178R als auch Arr3 K50R K153R eine deutlich verringerte Ubiquitinierung zeigten. Die Quantifizierung des Ubiquitinierungslevels anhand der Bandenintensitäten belegt, dass auch Arr3 K50R K153R, welches mit dem PTHR eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte Internalisierung aufwies (siehe Abb. 4.38), zu etwa 25 % weniger ubiquitiniert wurde als Arr3 WT (Abb. 4.42 B). Das Ubiquitinierungslevel von Arr3 K108R K178R betrug jedoch nur noch etwa 50 % des Wildtyp-Proteins.

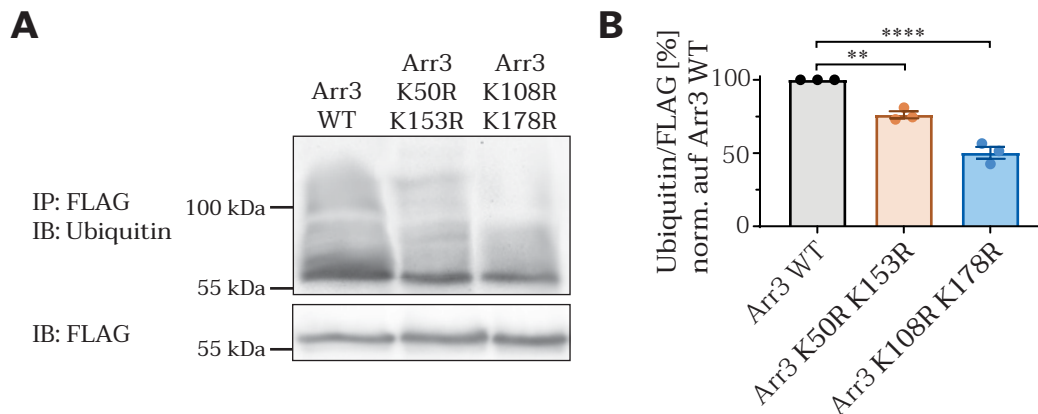


Abbildung 4.42 | Untersuchung des Ubiquitinierungslevels der Arr3-Doppelmutanten mittels Immunopräzipitation

A FLAG-markiertes Arrestin-3 wurde nach Stimulation des PTHR mit 1 μ M PTH 1-34 für 60 min bei 37 °C mit Anti-FLAG Affinitätsgel immunopräzipitiert. Nach Erstellung eines Western Blots aus den Präzipitaten wurde mit einem Ubiquitin-Antikörper das Ubiquitinierungslevel (oben) sowie mit einem FLAG-Antikörper die gesamte Menge des präzipitiertem Arr3-FLAG untersucht (unten).

B Die Intensität der Banden wurde quantifiziert und die Werte für die Ubiquitin-Intensität durch die FLAG-Intensität dividiert ($n = 3$ unabhängige Transfektionen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Arr3 K108R K178R eine deutlich reduzierte Ubiquitinierung im Vergleich zu Arr3 WT aufweist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die eingeschränkte Co-Internalisierung mit vielen Klasse-B-Rezeptoren durch die verminderte Ubiquitinierung der Mutante verursacht wird.

4.1.3 | Untersuchung von Inhibitoren posttranslationaler Modifikationen

4.1.3.1 | Untersuchung des Ubiquitinierungs-Inhibitors TAK-243

Um herauszufinden, ob eine Inhibierung der Ubiquitinierung von Arrestin-3 tatsächlich die Co-Internalisierung mit Klasse-B-GPCRs verhindert, sollte im nächsten Schritt die Ubiquitinierung pharmakologisch verhindert und die Auswirkungen auf den endosomalen Transport analysiert werden. Obwohl unter anderem von Shenoy *et al.* (2001) beschrieben wurde, dass die Ubiquitin-E3-Ligase Mdm2 für die Ubiquitinierung von Arrestin-3 verantwortlich ist und auch die Assoziation von Arrestin-3 und Mdm2 in Co-Immunopräzipitationen bereits nachgewiesen wurde (Wang *et al.*, 2003), konnten in präliminären Versuchen weder eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen in FRET-Messungen, noch eine gleichzeitige Lokalisation in denselben zellulären Kompartimenten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da somit nicht bestätigt werden konnte, dass Arrestin-3 durch die E3-Ligase Mdm2 ubiquitiniert wird, wurde ein Inhibitor der Ubiquitin-E1-Ligase Uba1 verwendet, welches in Säugetieren für die Aktivierung von 99 % des Ubiquitins verantwortlich ist (Hyer *et al.*, 2018), das später an andere Proteine angehängt wird, um die Ubiquitinierung von Arrestin zu unterbinden. Mit diesem Inhibitor, TAK-243, wurden HEK293T-Zellen zunächst in verschiedenen Konzentrationen für 4 h behandelt, bevor die Zellen lysiert und die zelluläre Ubiquitinierung mittels Western Blot kontrolliert wurde. In Abb. 4.43 ist gezeigt, dass im Vergleich zur Kontrolle, die mit 0,1 % DMSO behandelt wurde, schon bei einer vierstündigen Inkubation mit 1 μ M TAK-243 kaum noch Ubiquitinierung in den Zellen stattfand. Einzig eine Bande für unkonjugiertes Ubiquitin (ca. 8 kDa) konnte noch detektiert werden.

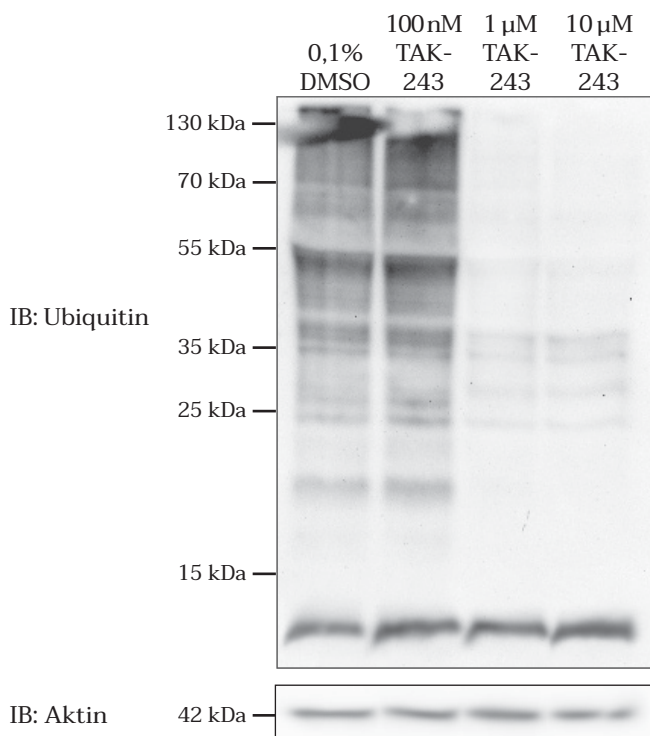


Abbildung 4.43 | Untersuchung der zellulären Ubiquitinierung nach Applikation verschiedener Konzentrationen TAK-243

Untransfizierte HEK293T-Zellen wurden für 4 h mit der angegebenen Konzentration DMSO (Kontrolle) oder TAK-243 inkubiert, anschließend lysiert und 40 μ g Protein auf einen Western Blot aufgetragen. Das Ubiquitinierungslevel wurde mittels Ubiquitin-Antikörper (oben) untersucht, zur Beladungskontrolle wurde ein Aktin-Antikörper verwendet (unten). Unkonjugiertes Ubiquitin ist bei ca. 8 kDa zu sehen. Die Abbildung zeigt repräsentative Blots von $n = 2$ unabhängigen Transfektionen.

In weiteren Western-Blot-Versuchen wurde überprüft, ob bereits eine verkürzte Inkubationszeit von 1 h die Ubiquitinierung ausreichend stark hemmt. Zudem wurde der Effekt auf die Ubiquitinierung von Arrestin-3 durch Immunopräzipitation analysiert. In Abb. 4.44 links ist erneut die Ubiquitinierung untransfizierter, lysierter HEK293T-Zellen dargestellt, die schon nach einstündiger Behandlung der Zellen mit 1 μ M TAK-243 deutlich reduziert ist. Im Gegensatz dazu wird die Ubiquitinierung von transfiziertem Arrestin-3 durch die Applikation von TAK-243 nicht komplett verhindert (Abb. 4.44 rechts). Für diese Experimente wurden Zellen, die transient mit PTHR und Arr3-FLAG transfiziert worden waren, für den angegebenen Zeitraum mit 1 μ M TAK-243 oder 0,1 % DMSO behandelt, wobei die Rezeptoren 60 min vor Ende dieser Inkubationszeit zusätzlich mit 1 μ M PTH 1-34 stimuliert wurden. Anschließend wurde Arr3-FLAG durch Immunopräzipitation isoliert und ein Western Blot erstellt. Die Abbildung dokumentiert, dass nach vierstündiger Applikation von TAK-243 die Polyubiquitinierung von Arrestin-3 blockiert wurde, jedoch ist immer noch eine Bande zu sehen, die vermutlich durch monoubiquitiniertes, FLAG-markiertes Arrestin-3 zustande kommt.

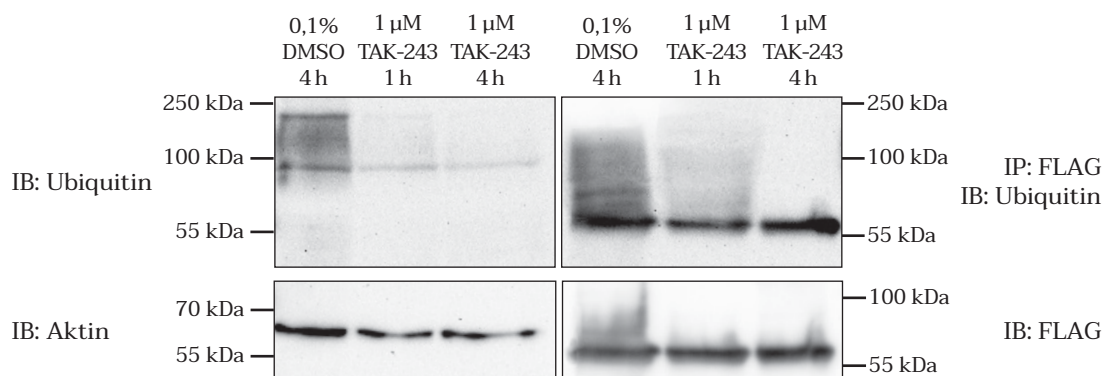


Abbildung 4.44 | Untersuchung der zellulären Ubiquitinierung sowie der Ubiquitinierung von Arrestin-3 nach unterschiedlich langer Applikation von 1 μ M TAK-243

Links: Untransfizierte HEK293T-Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 0,1 % DMSO (Kontrolle) oder 1 μ M TAK-243 inkubiert, anschließend lysiert und 40 μ g Protein auf einen Western Blot aufgetragen (links). Das Ubiquitinierungslevel wurde mittels Ubiquitin-Antikörper (oben) untersucht, zur Beladungskontrolle wurde ein Aktin-Antikörper verwendet (unten).

Rechts: Transient mit Arr3-FLAG und PTHR transfizierte Zellen wurden ebenso mit DMSO oder TAK-243 behandelt, wobei 60 min vor Ende der Inkubationszeit zusätzlich 1 μ M PTH 1-34 zur Rezeptoraktivierung zugegeben wurde. Das FLAG-markierte Arrestin-3 wurde anschließend mit Anti-FLAG Affinitätsigel immunopräzipitiert. Nach Erstellung eines Western Blots aus den Präzipitaten wurde mit einem Ubiquitin-Antikörper das Ubiquitinierungslevel (oben) sowie mit einem FLAG-Antikörper die gesamte Menge des präzipitiertem Arr3-FLAG untersucht (unten). Die Abbildung zeigt nicht reproduzierte Western Blots (n = 1).

Durch die Applikation des Ubiquitin-Ligase-Inhibitors TAK-243 wird die Ubiquitinierung von Arrestin somit größtenteils blockiert, auch wenn scheinbar weiterhin eine Monoubiquitinierung des Proteins möglich ist. Leider konnte der in Abb. 4.44 gezeigte Blot nicht reproduziert werden, da in weiteren Versuchen selbst in der Kontrollbedingung ohne TAK-243 keine Ubiquitinierung von Arrestin-3 nachgewiesen werden konnte. Somit ist noch nicht abschließend geklärt, ob TAK-243 die Ubiquitinierung von Arrestin-3 wirklich nur teilweise verhindert, wie Abb. 4.44 darstellt.

Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Anti-Ubiquitin-Antikörper, der zur Detektion der Ubiquitinierung in Western Blots verwendet wurde, aufgrund der hohen Proteinmenge auch unspezifisch an nicht-ubiquitiniertes Arrestin-3-FLAG binden konnte. Dies hätte zur Folge, dass die in Abb. 4.44 gezeigte Bande somit fälschlicherweise als ubiquitiniertes Arrestin-3 interpretiert wurde.

Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Western Blot Arr3-FLAG, welches nach Aktivierung durch den PTHR aus HEK293T-Zellen präzipitiert worden war, mit rekombinantem Arr3-FLAG, das in Rosetta™2(DE3)-kompetenten *E. coli* exprimiert und daher nicht ubiquitiniert worden war, verglichen. Wie in Abb. 4.45 (links) dargestellt ist, wurde das rekombinante Arr3-FLAG vom Ubiquitin-Antikörper jedoch nicht fälschlich erkannt. Außerdem wurde nach Behandlung des Western Blots mit FLAG-Antikörpern zwischen rekombinantem und immunopräzipitiertem Arrestin-3 ein Größenunterschied der beiden Proteine deutlich (Abb. 4.45 rechts), woran zu erkennen ist, dass das aus HEK293T-Zellen stammende Arr3-FLAG im Vergleich zum rekombinanten Arrestin posttranslational modifiziert wurde. Der Größenunterschied entspricht etwas weniger als den erwarteten 8 kDa eines Ubiquitin-Moleküls, jedoch zeigt dieses Experiment, dass in Abb. 4.44 kein unmodifiziertes Arrestin-3 detektiert wurde.

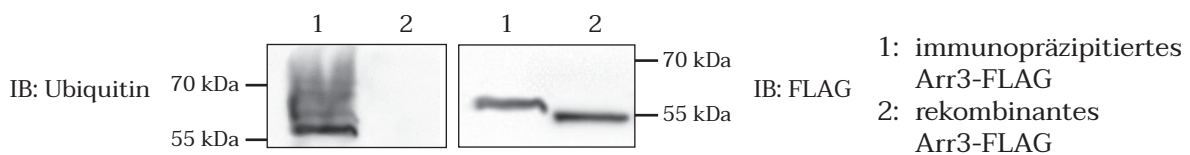


Abbildung 4.45 | Vergleich von immunopräzipitiertem und rekombinantem Arr3-FLAG

FLAG-markiertes Arrestin-3 wurde nach Stimulation des PTHR mit 1 μ M PTH 1-34 für 60 min bei 37 °C mit Anti-FLAG Affinitätsgel immunopräzipitiert. Rekombinantes Arr3-FLAG wurde aus Rosetta-kompetenten *E. coli* gewonnen. Nach Erstellung eines Western Blots wurde mit einem Ubiquitin-Antikörper das Ubiquitinierungslevel (oben) sowie mit einem FLAG-Antikörper die Proteingröße der beiden Arr3-FLAG-Varianten verglichen (unten). Die Abbildung zeigt nicht reproduzierte Western Blots ($n = 1$).

In einem weiteren Versuch sollte auf Basis der Hypothese, dass Arrestin tatsächlich durch Mdm2 ubiquitiniert wird, herausgefunden werden, ob Arrestin-3 nach Applikation von TAK-243 noch ubiquitiniert werden kann. Dabei wurde untersucht, ob Mdm2 nach Inkubation mit dem Inhibitor noch katalytisch aktiv ist. Die E3-Ligase Mdm2 ist unter anderem auch für die Ubiquitinierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 zuständig, welches daraufhin von Proteasomen abgebaut wird (Honda *et al.*, 1998, Momand *et al.*, 2000). Außerdem konnten Boyd *et al.* (2000) zeigen, dass p53 nach Co-Expression von Mdm2 nicht mehr im Zellkern, sondern vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist, da Mdm2, welches sich selbst im Nukleus befindet, für den Ausschluss von p53 aus dem Zellkern sorgt. Dafür ist jedoch eine intakte Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Mdm2 nötig, da katalytisch inaktive Mutanten von Mdm2 nicht in der Lage sind, den Export von p53 aus dem Zellkern zu induzieren. Wenn die Applikation des E1-Ligase-Inhibitors TAK-243 also die Ubiquitinierungsaktivität von Mdm2 stört, sollte dies ebenfalls dazu führen, dass p53 nicht mehr aus dem

Nukleus ausgeschlossen werden kann. Somit wäre anzunehmen, dass Mdm2 auch keine weiteren Substratproteine, wozu mutmaßlich auch Arrestin-3 gehört, ubiquitinieren kann.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde die Lokalisation von GFP-markiertem p53 und mCherry-markiertem Mdm2 in HEK293T-Zellen unter basalen Bedingungen sowie nach vierstündiger Applikation von 1 μ M TAK-243 konfokalmikroskopisch untersucht. Wie von Boyd *et al.* (2000) dokumentiert wurde, lokalisierte p53 bei alleiniger Expression fast ausschließlich im Nukleus der Zellen (Abb. 4.46 obere Reihe). Im Gegensatz dazu führte die Co-Expression von Mdm2 jedoch nicht zum beschriebenen Ausschluss von p53 aus dem Zellkern, sondern zur gemeinsamen Colokalisierten im Nukleus der HEK293T-Zellen (mittlere Reihe). Eine zusätzliche Inkubation mit TAK-243 hatte daher auch keinen weiteren Effekt auf die Lokalisation der Proteine (untere Reihe).

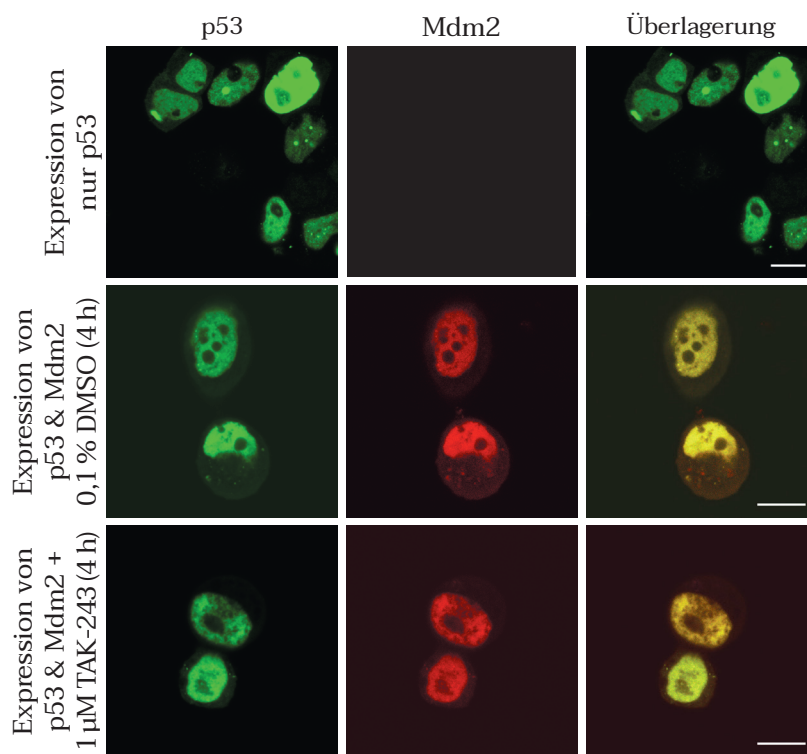


Abbildung 4.46 | Lokalisation von p53 und Mdm2 in HEK293T-Zellen

Die Zellen wurden transient mit p53-GFP und mCherry-Mdm2 transfiziert und mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Zur Behandlung mit TAK-243 wurden die Zellen zuvor 4 h mit 1 μ M TAK-243 inkubiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder von jeweils $n = 18$ Aufnahmen aus zwei unabhängigen Transfektionen.

Da die Experimente von Boyd *et al.* (2000) nicht in HEK293T-Zellen, sondern in NIH/3T3-Zellen durchgeführt worden waren, wurde diese Zelllinie in einem zweiten Versuch ebenfalls untersucht. In Abb. 4.47 ist jedoch zu sehen, dass auch mit NIH/3T3-Zellen bei Co-Expression von Mdm2 kein Ausschluss von p53 aus dem Nukleus erfolgte. Mit dieser Methode konnte somit keine Aussage darüber getroffen werden, ob Arrestin-3 nach der Applikation von TAK-243 noch ubiquitiniert werden kann.

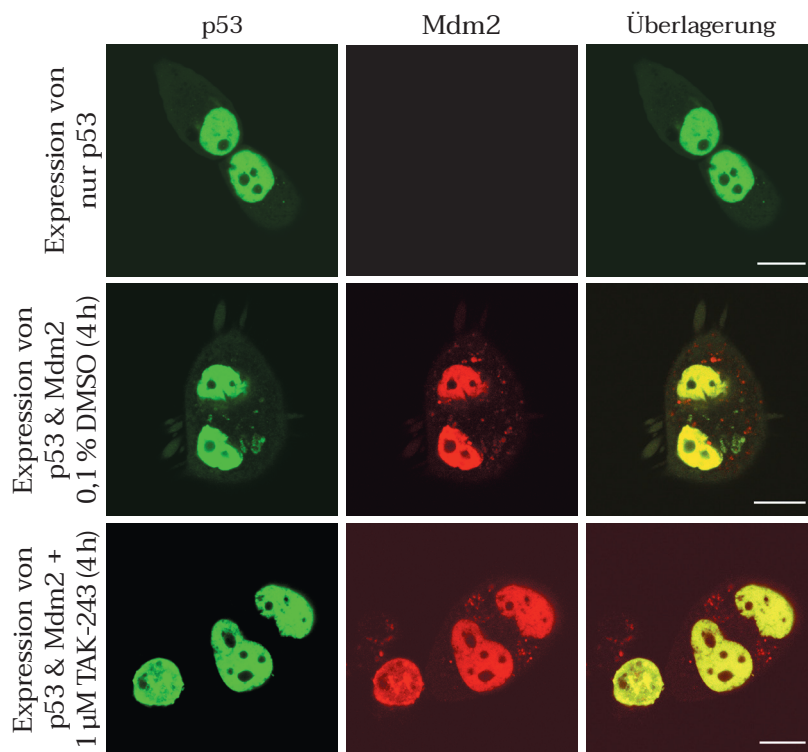


Abbildung 4.47 | Lokalisation von p53 und Mdm2 in NIH/3T3-Zellen

Die Zellen wurden transient mit p53-GFP und mCherry-Mdm2 transfiziert und mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Zur Behandlung mit TAK-243 wurden die Zellen zuvor 4 h mit 1 μ M TAK-243 inkubiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder von jeweils $n = 18$ Aufnahmen aus zwei unabhängigen Transfektionen.

Trotz dieser Ungewissheit wurde im Folgenden überprüft, ob Arrestin-3 nach vierstündiger Inkubation mit TAK-243 noch mit dem Klasse-B-Rezeptor PTHR in Endosomen internalisiert werden konnte. Hierfür wurde 30 min vor Ende der Inkubationszeit zusätzlich 1 μM PTH 1-34 zugegeben, um die Rezeptoren zu aktivieren. Wie in Abb. 4.48 A dargestellt ist, hatte der Ubiquitin-Ligase-Inhibitor jedoch keinen Einfluss auf den endosomalen Transport des Wildtyp-Arrestins und auch eine zehnfache Erhöhung der Konzentration von TAK-243 auf 10 μM konnte die Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit dem PTHR nicht signifikant behindern (Abb. 4.48 B). Zwar führte die Applikation von TAK-243 zu größeren Schwankungen der Pearson-Korrelationskoeffizienten, jedoch wiesen die meisten ausgewerteten Zellen noch eine deutliche Lokalisation des Arrestins in Endosomen auf. Obwohl TAK-243 die Ubiquitinierung von Arrestin-3 größtenteils verhinderte (Abb. 4.44), hatte der Inhibitor somit keine Auswirkung auf die Internalisierung des Arrestins. Dies könnte daran liegen, dass auch eine Monoubiquitinierung des Proteins für seine Aufnahme ins Zellinnere ausreicht, oder neben der Ubiquitinierung noch weitere Faktoren über die Internalisierung des Arrestins entscheiden.

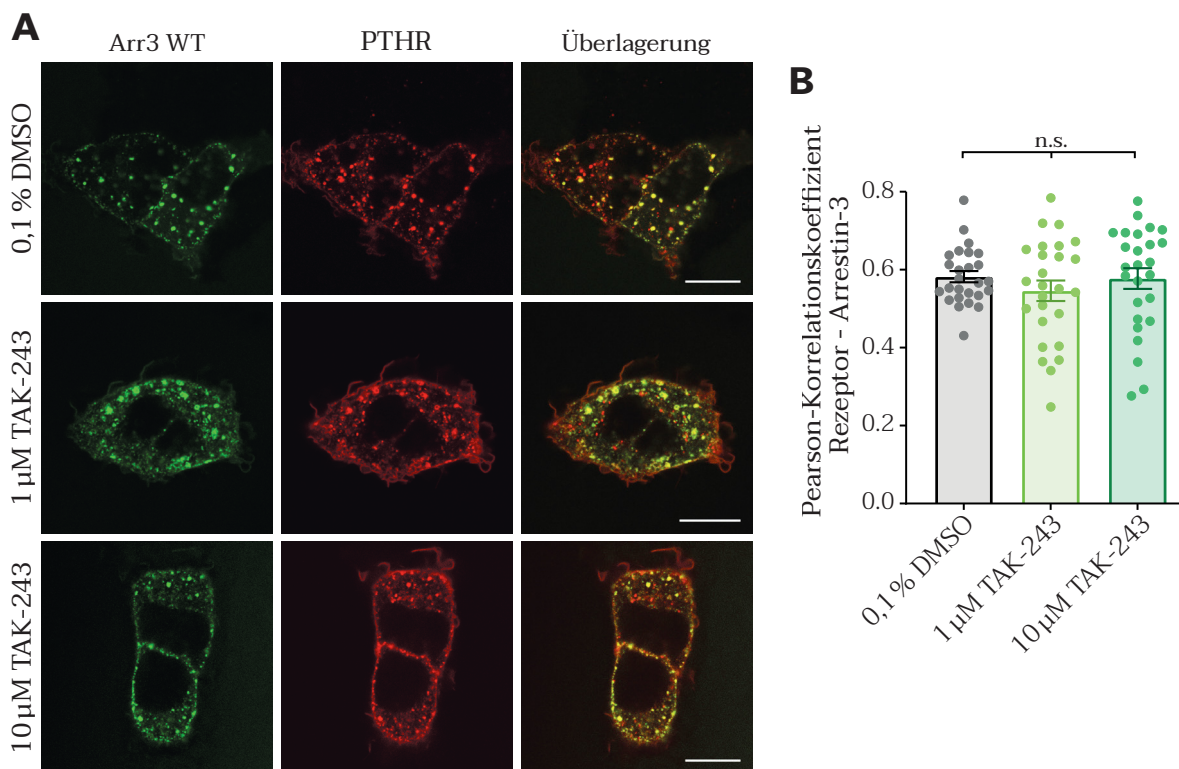


Abbildung 4.48 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 nach Applikation von TAK-243 und Aktivierung des PTHR

A Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 4 h mit der angegebenen Konzentration TAK-243 oder DMSO (Kontrolle) bei 37 °C inkubiert. 30 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die Rezeptoren mit 1 μM PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μm .

B Die Colokalisation von PTHR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (DMSO: $n = 26$; 1 μM TAK-243: $n = 26$; 10 μM TAK-243: $n = 26$ von zwei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $p \geq 0,05$).

4.1.3.2 | Untersuchung des SUMOylierungs-Inhibitors 2-D08

Da Lysin-zu-Arginin-Mutationen in Arrestin-3 die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren beeinflussen, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben wurde, der Ubiquitinierungsinhibitor TAK-243 jedoch keinen Einfluss darauf hatte, wurde überprüft, ob die Hemmung der SUMOylierung, welche ebenfalls an Lysinresten stattfindet, zu einer ähnlichen Beeinträchtigung der Internalisierung von Arrestin-3 führt wie die beschriebenen Mutationen. Hierfür wurde der Inhibitor 2-D08 eingesetzt, der den Transfer von SUMO von der einzigen SUMO-E2-Ligase Ubc9 (Guo *et al.*, 2007) auf Substratproteine verhindert und die zelluläre SUMOylierung effektiv hemmen sollte (Kim *et al.*, 2014). Da mit 2-D08 keine Western Blots erstellt wurden, um zu überprüfen, in welcher Konzentration und mit welcher Inkubationszeit der Inhibitor für eine möglichst vollständige Inhibition der SUMOylierung eingesetzt werden sollte, wurden die HEK293T-Zellen in verschiedenen Konzentrationen (20 μM und 50 μM) und verschieden lange (4 h und 24 h) mit 2-D08 inkubiert. Da sich jedoch kein Unterschied zwischen 20 μM und 50 μM 2-D08 ergab, sind in Abb. 4.49 nur repräsentative Bilder der höheren Konzentration dargestellt. Wie dort zu erkennen ist, internalisierte Arrestin-3 nach 30-minütiger Stimulation des PTHR unabhängig von der Inkubationszeit des Inhibitors 2-D08 in Endosomen. Selbst die Applikation von 2-D08 und TAK-243 zusammen beeinträchtigte die Internalisierung des Arrestins nicht. Zwar ist nicht abschließend geklärt, ob 2-D08 in der gewählten Konzentration die SUMOylierung in HEK293T-Zellen ausreichend inhibiert wird, die präliminäre Analyse der Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit dem PTHR konnte jedoch keine Auswirkung des Inhibitors auf die Internalisierung Arrestins zeigen.

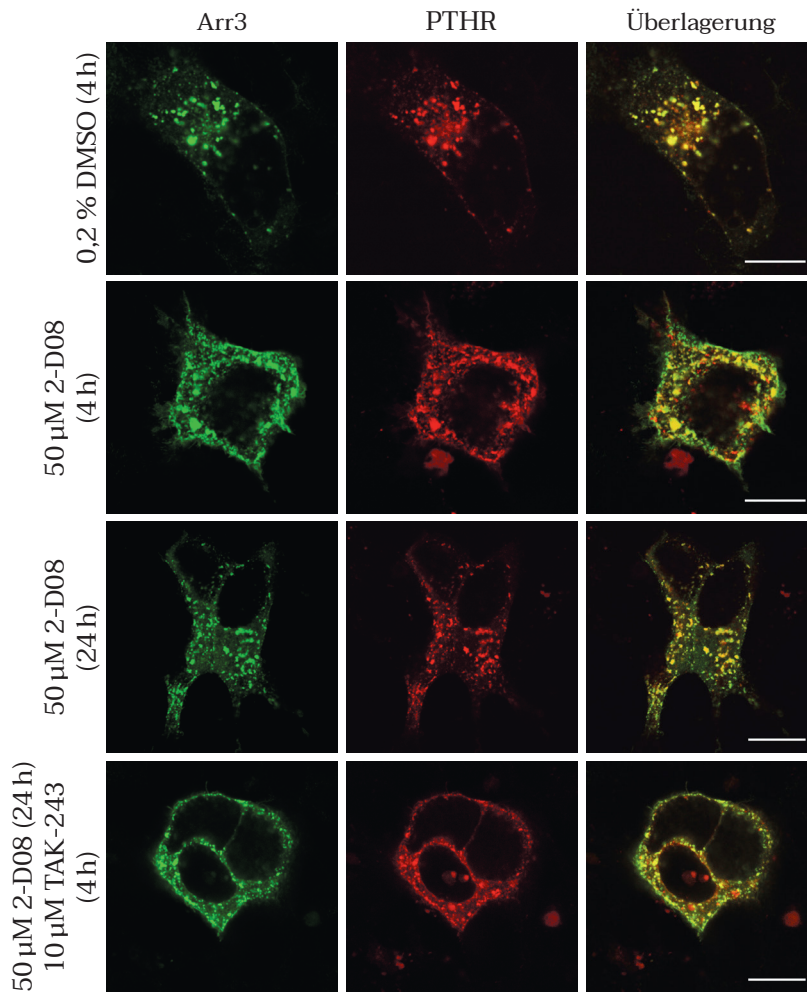


Abbildung 4.49 | Zelluläre Lokalisation von Arr3 nach Applikation von 2-D08 und Aktivierung des PTHR

Transient mit PTHR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit DMSO (Kontrolle), 2-D08 oder 2-D08 und TAK-243 bei 37°C inkubiert. 30 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die Rezeptoren mit 1 µM PTH 1-34 stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 µm. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder von jeweils n = 10 Aufnahmen aus einer Transfektion.

In dieser Arbeit hatte somit weder die Applikation eines Ubiquitinierungs- noch eines SUMOylierungs-Inhibitors einen Effekt auf die Internalisierung von Wildtyp-Arrestin mit dem PTH-Rezeptor. Somit konnte nicht bestätigt werden, dass eine der beiden posttranslationalen Modifikationen alleine dafür verantwortlich ist, dass Arrestin-3 mit Klasse-B-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen wird.

4.2 | Untersuchung von Agonisten mit verschiedenen Dissoziationshalbwertszeiten

In einem weiteren Projekt sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Affinität verschiedener Agonisten auf die Stabilität von Rezeptor-Agonist-Komplexen hat. Da bekannt ist, dass die Bindung von Arrestin am Isoprenalin-aktivierten Rezeptor die Affinität des Liganden zum Rezeptor erhöht (Gurevich *et al.*, 1997), stellte sich die Frage, ob Liganden, die lange am Rezeptor binden, umgekehrt auch zu einer stabileren Bindung des Arrestins führen. Von besonderem Interesse war dabei, ob Klasse-A-Rezeptoren nach der Stimulation mit einem solchen Agonisten mit Arrestin-3 co-internalisieren und damit ihr Verhalten zu Klasse B verändern können. Hierfür wurden verschiedene Agonisten des μ OR in zwei Messmethoden getestet. Dazu zählten der synthetische Peptidligand [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin (DAMGO), der Partialagonist Morphin, Etorphin, das eine sehr hohe Affinität zum μ OR hat (McPherson *et al.*, 2010), sowie der funktionell selektive („biased“) Ligand SR17018, der eine verringerte Rekrutierung von Arrestin-3 aufweist (Grim *et al.*, 2020). Zuerst wurde in FRET-Experimenten untersucht, welchen Einfluss der verwendete Agonist auf die off-Kinetik des Arrestins vom μ OR hat. In Abb. 4.50 A sind die vollständigen Messungen dargestellt. Alle Zellen wurden 120 s lang mit den unterschiedlichen Agonisten in der angegebenen Konzentration stimuliert und die Liganden anschließend durch Umspülen der Zellen mit Puffer wieder ausgewaschen. Da hierbei unterschiedliche Auswaschkinetiken des FRET-Signals entstanden, wurden in Abb. 4.50 B alle Einzelmessungen auf die maximale Antwort normalisiert, um die off-Kinetiken besser vergleichen zu können. Die Quantifizierung der Kinetik durch monoexponentielle Kurvenfits (Abb. 4.50 C) bestätigte, dass Arrestin-3 nach beendeter

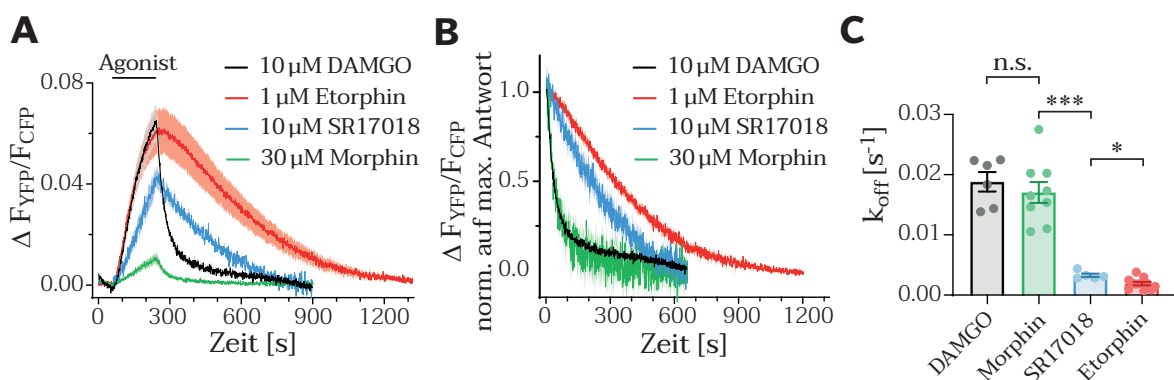


Abbildung 4.50 | Interaktion von Arrestin-3 mit dem μ OR in FRET-Messungen

A Die FRET-Messungen zwischen mTurq-markiertem Arrestin-3 und YFP-markiertem μ OR wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.2.5 beschrieben. Nach Applikation von FRET-Puffer für 60 s wurden die Zellen für 120 s mit dem angegebenen Agonist perfundiert und die Liganden anschließend wieder mit FRET-Puffer ausgewaschen. Die *Baselines* aller Kurven wurden auf die fünf letzten Werte vor Agonistgabe normalisiert und die FRET-Änderungen als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

B Zum besseren Vergleich der off-Kinetiken wurden alle Einzelmessungen auf die maximale Antwort normalisiert und nur die Auswaschphasen dargestellt.

C Die Auswaschkinetik jeder einzelnen Kurve wurde durch monoexponentielle Kurvenanpassung quantifiziert und die k_{off} -Werte als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen (DAMGO (D): $n = 6$; Etorphin (E): $n = 11$; SR17018 (S): $n = 6$; Morphin (M): $n = 9$ von zwei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Stimulation mit DAMGO und Morphin mit ähnlicher Geschwindigkeit vom Rezeptor dissoziiert, obwohl Morphin als partieller Agonist zu einer deutlich geringeren absoluten Rekrutierung von Arrestin-3 zum Rezeptor führte. Sowohl SR17018 als auch Etorphin zeigten im Vergleich dazu deutlich langsamere Auswaschkinetiken. Da in FRET-Messungen nur die Dissoziation von Arrestin während des Auswaschens des Agonisten untersucht werden kann, wobei der Rezeptor eine Konformationsänderung vom aktiven in den inaktiven Zustand durchläuft, hängen die in diesen Experimenten ermittelten Dissoziationskinetiken von Arrestin auch von den Dissoziationshalbwertszeiten der verwendeten Agonisten ab.

Um zu untersuchen, ob die Affinität von Arrestin im aktiven Zustand des Rezeptors durch die unterschiedlichen Liganden beeinflusst wird, wurden FRAP-Messungen durchgeführt, mit denen die Stabilität von Arrestin-Rezeptor-Komplexen in Gegenwart des Agonisten, also bei kontinuierlicher Rezeptoraktivierung, analysiert werden kann. Hierbei ergab sich jedoch kein Unterschied in der Fluoreszenzwiederkehr der mTurquoise-markierten Arrestine zwischen den einzelnen Agonisten (Abb. 4.51 A). Die mit YFP markierten Rezeptoren kehrten in allen Bedingungen ebenfalls mit ähnlicher Kinetik und in ähnlichem Ausmaß zurück (Abb. 4.51 B). Daraus lässt sich schließen, dass die Bindungshalbwertszeiten der Liganden keinen Einfluss auf die Austauschrate des Arrestins am aktivierten Rezeptor haben und die Stabilität der Rezeptor-Arrestin-Komplexe nicht vom verwendeten Agonisten abhängt. Die langsameren Dissoziationskinetiken von Arrestin-3 in den FRET-Messungen (Abb. 4.50) hängen daher nicht mit einer stabileren Bindung des Arrestins am Rezeptor zusammen, sondern beruhen wie vermutet auf den längeren Bindungs-Halbwertszeiten der Agonisten SR17018 und Etorphin.

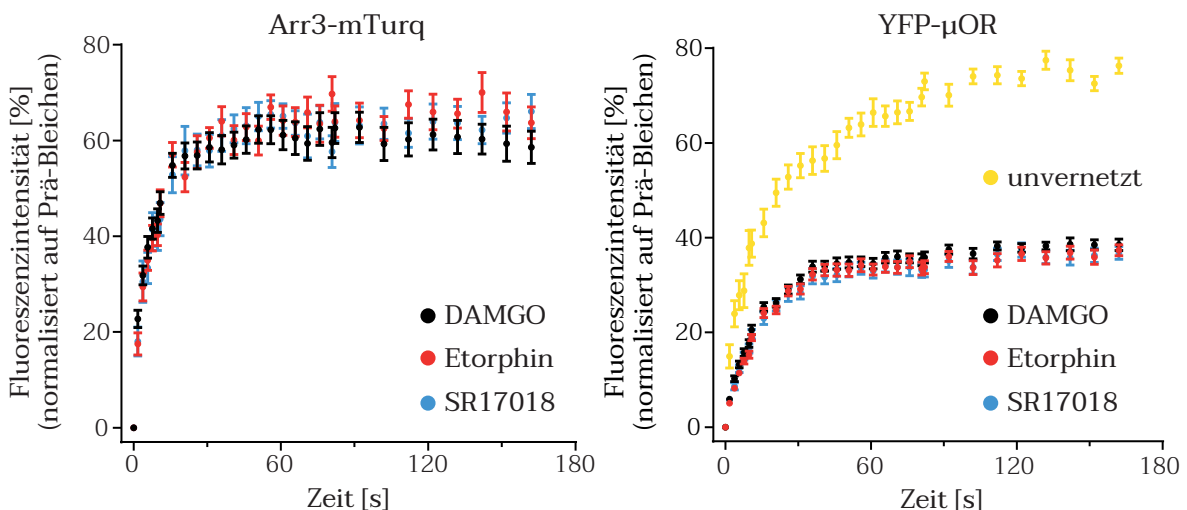


Abbildung 4.51 | Interaktion von Arrestin-3 mit dem μ OR in FRAP-Messungen

Die FRAP-Messungen wurden durchgeführt, wie in Kap. 3.3.5.3 beschrieben. Die Rezeptoren wurden für 15 min bei 37 °C bzw. Raumtemperatur (unvernetzte Rezeptoren) mit 10 μ M DAMGO, 1 μ M Etorphin oder 10 μ M SR17018 stimuliert und anschließend die Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen simultan für mTurq-markiertes Arr3 (links) und YFP-markierte Rezeptoren (rechts) aufgenommen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM (DAMGO: n = 34; Etorphin: n = 34; SR17018: n = 32 von drei unabhängigen Messtagen).

Bei der Analyse der Internalisierung wurde deutlich, dass auch keiner der Agonisten mit langer Dissoziationshalbwertszeit dazu führte, dass Arrestin-3 mit dem μ OR, einem Klasse-A-Rezeptor, internalisierte (Abb. 4.52 A). Die Quantifizierung der Colokalisation von μ OR und Arrestin-3 bestätigte durch die eher niedrigen Pearson-Korrelationskoeffizienten (Abb. 4.52 B), dass eine verlängerte Bindungsdauer des Liganden am Rezeptor, wie sie von SR17018 und Etorphin gezeigt wurde, nicht ausreicht, um die Co-Internalisierung von Arrestin mit dem Rezeptor zu induzieren und den Klasse-A-Rezeptor in Klasse B zu verwandeln.

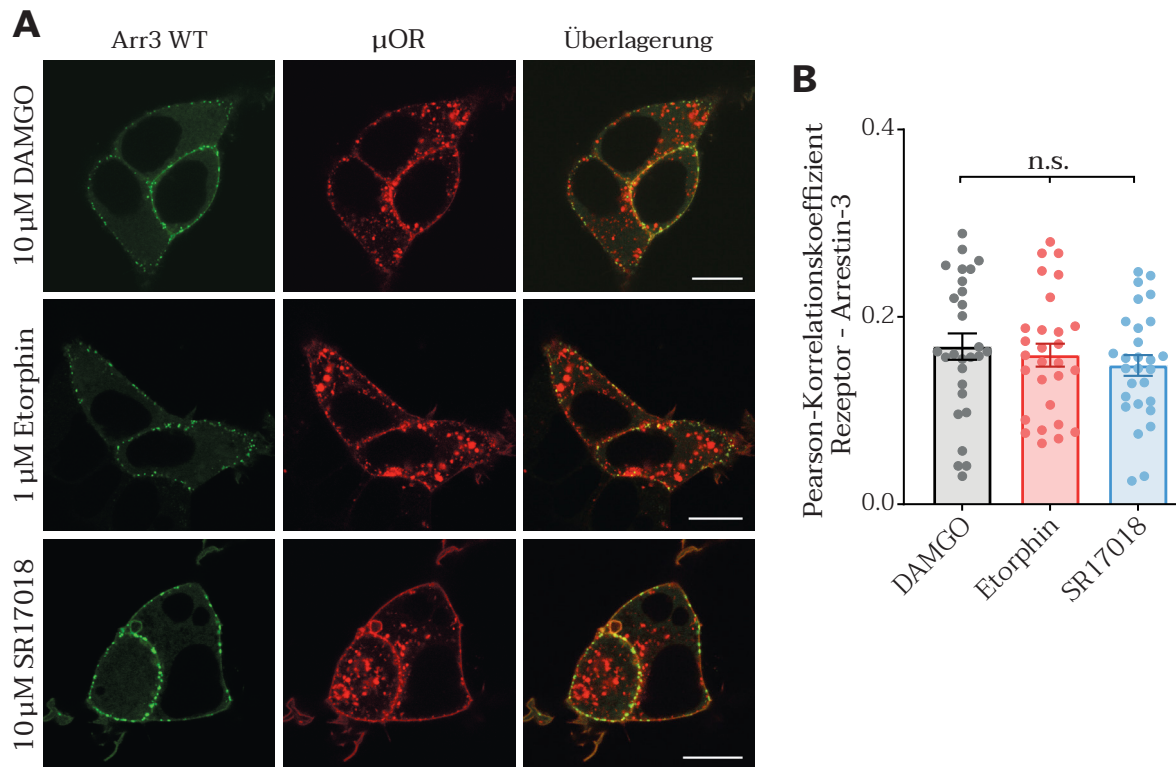


Abbildung 4.52 | Lokalisation von Arr3 nach Aktivierung des μ OR mit verschiedenen Agonisten

A Transient mit μ OR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min mit den angegebenen Agonisten stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

B Die Colokalisation von μ OR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (DAMGO: n = 28; Etorphin: n = 28; SR17018: n = 28 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $p \geq 0,05$).

Dieses Ergebnis wurde durch Versuche mit dem β_2 AR bestätigt, wobei als hochaffiner Agonist BI-167107 verwendet wurde, das eine Bindungshalbwertszeit von ca. 30 h hat und zur Kristallisation des β_2 AR in seiner aktiven Konformation eingesetzt wurde (Rasmussen, Choi *et al.*, 2011). Abb. 4.53 zeigt, dass auch beim β_2 AR ein Ligand mit besonders langer Bindungsdauer am Rezeptor nicht in der Lage war, die Internalisierung von Arrestin-3 mit dem prototypischen Klasse-A-Rezeptor zu induzieren.

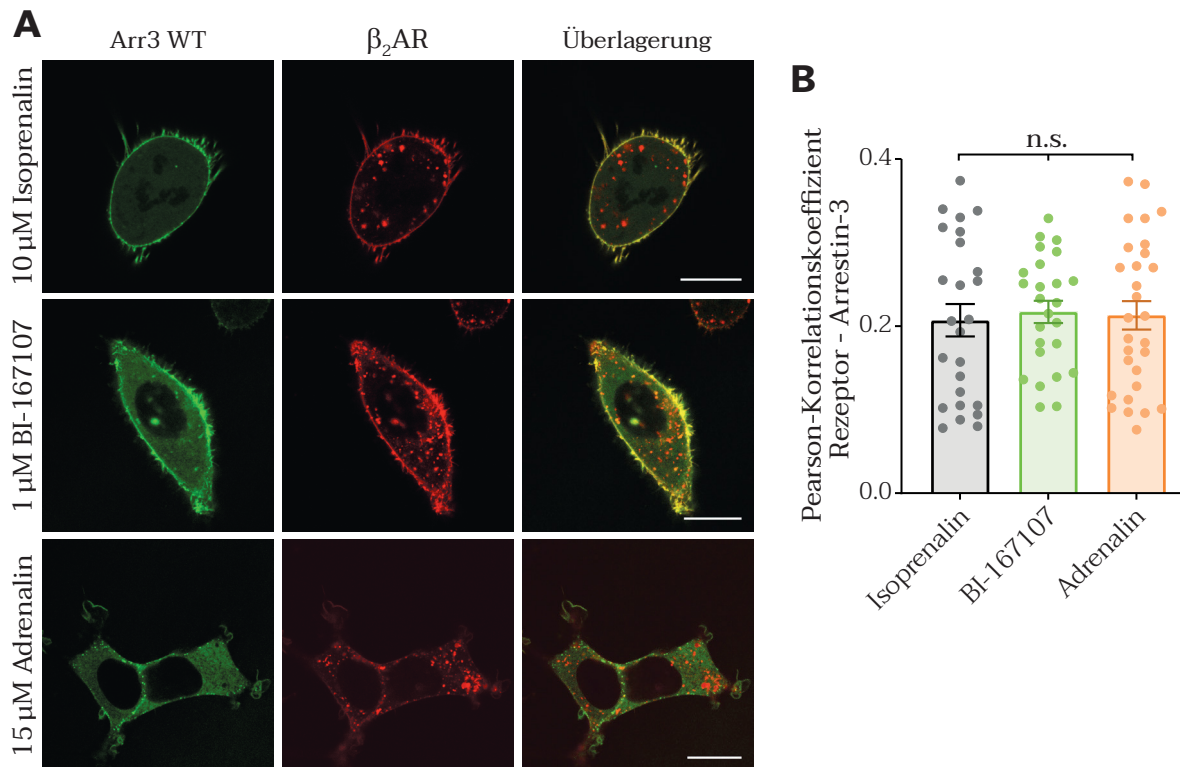


Abbildung 4.53 | Lokalisation von Arr3 nach Aktivierung des β_2 AR mit verschiedenen Agonisten

A Transient mit β_2 AR-mCherry, GRK2 und Arr3-GFP transfizierte Zellen wurden für 30 min mit den angegebenen Agonisten stimuliert und anschließend mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

B Die Colokalisation von μ OR und Arrestin-3 in konfokalen Bildern wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Isoprenaline: n = 25; BI-167107: n = 25; Adrenalin: n = 25 von drei unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns p \geq 0,05).

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die Bindungsdauer des Agonisten am Rezeptor keine Auswirkungen auf die Stabilität von Rezeptor-Arrestin-Komplexen hat und daher auch nicht die Co-Internalisierung von Arrestin-3 beeinflusst. Klasse-A-Rezeptoren lassen sich somit nicht mithilfe von Agonisten mit besonders langer Bindungsdauer in Klasse-B-Rezeptoren umwandeln.

Die Ergebnisse im Kap. 4.2 wurden aus der im April 2021 beim *British Journal of Pharmacology* eingereichten und in Revision befindlichen Publikation entnommen:

Mösslein, N., Pohle, L.-M. G., Fuss A., Bünemann, M., Krasel, C.; "Residency time of agonists does not affect the stability of GPCR-arrestin complexes", *British Journal of Pharmacology*

Kapitel 5 | Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Internalisierung von Arrestin mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren durch verschiedene Maßnahmen verhindert werden, um zu erreichen, dass diese sich wie Klasse-A-Rezeptoren verhalten. Da der Ubiquitinierung von Arrestin in früheren Studien eine besondere Rolle zugeschrieben wurde, fokussierte sich ein Großteil dieser Arbeit darauf, die Ubiquitinierung Arrestins entweder an spezifischen Ubiquitinierungsstellen durch gezielte Mutationen bzw. die Verwendung eines lysinfreien Arrestins oder durch die Applikation eines E1-Ligase-Inhibitors vollständig zu verhindern. Außerdem wurde untersucht, welchen Einfluss Agonisten mit besonders langer Bindungsdauer an Klasse-A-Rezeptoren auf die Internalisierung des Arrestins haben.

5.1 | Methoden

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet, um die Interaktion von Arrestin-3 mit unterschiedlichen GPCRs zu untersuchen. Mithilfe von FRET-Experimenten in Einzelzellen wurde die agonistinduzierte Rekrutierung der Arrestine zu verschiedenen Rezeptoren sowie deren Dissoziation vom Rezeptor beim Auswaschen des Liganden beobachtet. Mittels Zweifarben-FRAP konnte dagegen auch die Stabilität von Arrestin-Rezeptorkomplexen in kontinuierlicher Gegenwart eines Agonisten beurteilt werden. Außerdem wurde durch Konfokalmikroskopie die Co-Internalisierung von Arrestin und verschiedenen Rezeptoren visualisiert.

In FRET-Messungen können die Assoziations- und Dissoziationskinetiken des Arrestins sowie das Ausmaß der Rekrutierung zu verschiedenen GPCRs analysiert werden. Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Translokation der cytosolischen Arrestine sowie zur Bindung an den GPCR, was in einem FRET-Anstieg resultiert. Diese Methode wurde in dieser Arbeit hauptsächlich dazu verwendet, die Funktionalität der erstellten Arrestin-Mutanten zu überprüfen und deren Bindungsverhalten mit Wildtyp-Arrestin zu vergleichen. Wird der Ligand durch Umspülen der Zelle mit Pufferlösung ausgewaschen, durchläuft der Rezeptor eine Konformationsänderung vom aktiven zurück in den inaktiven Zustand, die vom Arrestin wahrgenommen wird und zur Dissoziation vom Rezeptor führt. Da die Dissoziationskinetik des Arrestins in den FRET-Messungen somit auch von der Bindungshalbwertszeit des Liganden abhängt, eignen sich diese Experimente, wie in Kap. 4.2 gezeigt wurde, nicht, um den Einfluss von verschiedenen Agonisten auf die Bindungsstabilität des Arrestins am Rezeptor zu untersuchen.

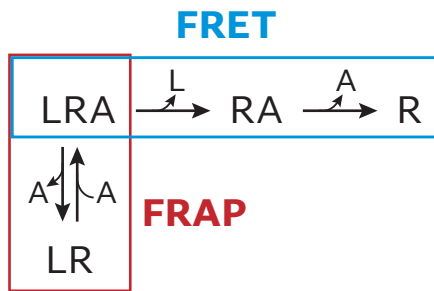


Abbildung 5.1 | Vergleich von FRET und FRAP

Schematische Darstellung der Vorgänge, die ausgehend vom ternären Komplex aus Ligand (L), Rezeptor (R) und Arrestin (A) mit FRET- (blau) oder FRAP-Messungen (rot) beobachtet werden können.

Während bei den FRET-Messungen ausgehend vom ternären Komplex aus Rezeptor, Ligand und Arrestin zuerst der Ligand ausgewaschen wird und daraufhin auch das Arrestin vom Rezeptor dissoziiert, werden FRAP-Messungen in kontinuierlicher Gegenwart des Liganden durchgeführt, sodass beobachtet werden kann, wie schnell Arrestin an einem dauerhaft aktivierten Rezeptor ausgetauscht wird (siehe Abb. 5.1). Somit kann die Stabilität der Rezeptor-Arrestin-Komplexe ohne störenden Einfluss der Dissoziationskinetik des Agonisten untersucht werden. Bei FRAP wird die Mobilität von Arrestin-3 durch die Fluoreszenzwiederkehr in einem geblichenen Ausschnitt der Membran bestimmt, wobei die Rezeptoren durch Quervernetzung mit Antikörpern in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt sind. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der das fluoreszierende Arrestin zurückkehrt, spiegelt daher zwei Vorgänge wider. Zum einen können stabile Rezeptor-Arrestin-Komplexe trotz Vernetzung in geringem Maße lateral in der Plasmamembran diffundieren, wodurch die Fluoreszenzintensitäten von Rezeptor und Arrestin mit gleicher Kinetik wieder ansteigen. Andererseits kann gebliches Arrestin-3 vom agonistbesetzten Rezeptor abdiffundieren und daraufhin ein weiteres, fluoreszierendes Arrestin-Molekül an den Rezeptor binden, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität im geblichenen Ausschnitt der Membran führt. Mit dieser Methode kann somit die Austauschrate des Arrestins am aktivierten Rezeptor beobachtet und die Stabilität von Rezeptor-Arrestin-Komplexen abgeschätzt werden.

Zur Beurteilung der Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit verschiedenen GPCRs wurde die Lokalisation des Arrestins nach 30-minütiger Stimulation transient transfizierter Zellen konfokalmikroskopisch untersucht. Um relative Unterschiede im Ausmaß der Internalisierung von Arrestin zu beurteilen, wurde die Colokalisation mit internalisierten Rezeptoren mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Bei der Verwendung nicht-fluoreszenzmarkierter Rezeptoren (wie bei AT₁R, V₂R oder EP4) wurde die Lokalisation der Arrestine in den Endosomen, in denen sich die Rezeptoren nach ihrer Internalisierung befinden, mithilfe des endosomalen Markers EEA1 detektiert. Der Pearson-Korrelationskoeffizient ist ein Maß für den linearen Zusammenhang der Fluoreszenzintensitäten zwischen zwei Farbkanälen eines Bildes. Da bei der Berechnung des Koeffizienten (siehe Kap. 3.3.4.2) von jedem Pixel der Mittelwert der Signalintensität abgezogen wird, ist der Pearson-Korrelationskoeffizient unabhängig von unterschiedlichen Gesamtintensitäten oder der Hintergrundfluoreszenz in den einzelnen Kanälen. Die Bilder müssen daher nicht bearbeitet werden, sodass die Anwendung des Korrelationskoeffizienten sehr einfach ist. Es sollte

jedoch darauf geachtet werden, dass Bereiche, in denen die beiden markierten Proteine in keinem Fall vorkommen können, z.B. im Extrazellularraum, von der Berechnung ausgeschlossen werden. Diese Pixel weisen in beiden Kanälen sehr niedrige Fluoreszenzintensitäten auf und führen dadurch zu höheren Werten des Koeffizienten. Außerdem muss jede aufgenommene Zelle einzeln betrachtet werden, da unterschiedliche Expressionslevel in verschiedenen Zellen im selben Bild dazu führen können, dass das Ausmaß der Korrelation unterschätzt wird. Auch wenn die Bedeutung von extremen Werten (1 oder -1) meist eindeutig ist, ist die Interpretation von Werten im mittleren Bereich schwierig, sodass Kontrollbedingungen nötig sind, um valide Aussagen treffen zu können. In dieser Arbeit wurde daher die Colokalisation der erstellten Arrestin-3-Mutanten gegenüber Wildtyp-Arrestin verglichen, um das Ausmaß der Co-Internalisierung der Arrestin-Mutanten mit verschiedenen GPCRs zu beurteilen.

Zur Untersuchung der Ubiquitinierung von Arrestin-3 konnte in dieser Arbeit kein biophysikalischer Assay etabliert werden. Sowohl die BRET- als auch die FRET-Versuche mit fluoreszenzmarkiertem Arrestin und Ubiquitin wurden hierbei in 96-Well-Platten durchgeführt, sodass jede Messung die durchschnittliche Fluoreszenzänderung aus zahlreichen Zellen aufnahm. Zudem wurden die Zellen während der Experimente bei einer konstanten physiologischen Temperatur von 37 °C inkubiert, um die nach der Aktivierung des Rezeptors angeschalteten Signalkaskaden effektiver ablaufen zu lassen, als dies bei Raumtemperatur funktionieren würde. Obwohl nach der Stimulation des PTHRs sowohl mit FRET als auch mit BRET ein Anstieg der Emissionsverhältnisse innerhalb des 20-minütigen Messfensters dokumentiert werden konnte, war mit beiden Messmethoden kein Unterschied zur Kontrollgruppe, in der keine Ubiquitinierung stattfinden konnte, erkennbar. Da die Erhöhung des FRET-/BRET-Signals somit nicht spezifisch war, waren beide Methoden ungeeignet, um die Ubiquitinierungslevel zu messen. Da inzwischen jedoch bekannt ist, dass der verwendete Monochromator des Plattenlesegeräts Tecan Spark bei der Durchführung dieser Versuche defekt war, könnte eine erneute Wiederholung dieser Experimente zielführend sein.

Stattdessen wurde zur semiquantitativen Untersuchung der Ubiquitinierungslevel FLAG-markiertes Arrestin-3 immunopräzipitiert und die Verknüpfung mit endogenem Ubiquitin analysiert. Dies hat den Vorteil, dass es nicht zu einer unphysiologischen konstitutiven Ubiquitinierung von Proteinen kommen kann, die bei der Überexpression von Ubiquitin auftreten kann (Sigismund und Polo, 2016). Da die Ubiquitinierung von Proteinen ein reversibler Prozess ist und durch Deubiquitinasen leicht rückgängig gemacht werden kann, mussten alle bei der Immunopräzipitation verwendeten Puffer (z.B. Lysepuffer) mit Deubiquitinase-Inhibitoren versetzt werden (Emmerich und Cohen, 2015). Die bekannten Deubiquitinasen gehören entweder zu den Metallo- oder Cysteinproteasen. Daher wurde zum einen EDTA verwendet, um Metallionen zu komplexieren und zum anderen allen Puffern 10 mM N-Ethylmaleinimid hinzugefügt, um Cysteinreste, die im katalytischen Zentrum der Cysteinproteasen vorkommen, zu alkylieren (Emmerich und Cohen, 2015). Trotz dieser Maßnahmen konnte nicht immer eine Modifikation des Arrestins mit Ubiquitin

nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4.1.3.1). Wenn dies nicht auf andere Fehlerquellen zurückzuführen ist (z.B. die zur Detektion verwendeten Antikörper), könnte eine Erhöhung der N-Ethylmaleimid-Konzentration oder eine Verkürzung der Zeit zwischen der Zelllyse und der Denaturierung der Proteine zu besseren Ergebnissen führen (Emmerich und Cohen, 2015).

Insgesamt konnte durch die Kombination der beschriebenen Methoden untersucht werden, wie sich verschiedene Mutationen, Inhibitoren oder unterschiedliche Agonisten auf die Wechselwirkung von Arrestin-3 mit GPCRs, deren Co-Internalisierung sowie das Ubiquitinierungslevel von Arrestin auswirken.

5.2 | Einfluss der Ubiquitinierung von Arrestin-3 auf die Internalisierung

5.2.1 | Untersuchung der Lysine 11 und 12 als Ubiquitinierungsstellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass die beiden benachbarten Lysine 11 und 12 in Arrestin-3, die auch in den anderen Arrestin-Isoformen vorkommen, mit den negativ geladenen Phosphatresten im C-Terminus von GPCRs interagieren (Zhou *et al.*, 2017, Staus *et al.*, 2020, Huang *et al.*, 2020). Werden diese Lysine zu Argininen mutiert (Arr3 KK11RR), ist die Co-Internalisierung mit dem AT₁R beeinträchtigt. Außerdem weist die Mutante nach der Aktivierung des AT₁R nicht mehr die typischerweise durch Klasse-B-Rezeptoren ausgelöste stabile Ubiquitinierung auf (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Da die Internalisierung von Arr3 KK11RR jedoch durch die direkte Fusion eines Ubiquitinmoleküls an den C-Terminus wiederhergestellt werden konnte, wurde die vorher reduzierte Co-Internalisierung der Mutante auf eine verhinderte Ubiquitinierung der mutierten Lysine 11 und 12 zurückgeführt. In FRET- und FRAP-Experimenten wurde zusätzlich festgestellt, dass Arr3 KK11RR im Vergleich zu Wildtyp-Arrestin deutlich instabilere Komplexe mit Klasse-B-Rezeptoren bildet und schneller von den Rezeptoren abdissoziiert (Zindel, 2015). Weiterhin zeigten Docking-Untersuchungen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Hildebrand (Universität Leipzig/Charité Berlin) durchgeführt wurden, eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Affinität von Arr3 KK11RR zum eigenen C-Terminus. Dieser ist in der basalen Konformation an der N-Domäne gebunden, sodass der inaktive Zustand der KK11RR-Mutante stark stabilisiert wird und ihre vollständige Aktivierung von Arr3 KK11RR durch GPCRs im Vergleich zu Wildtyp-Arrestin erschwert ist. Zudem wurde vermutet, dass die Mutante nach der erfolgten Aktivierung wieder schneller in ihre basale Konformation zurückkehrt und aus diesem Grund auch schneller von Rezeptoren dissoziiert.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Aktivierung von Arr3 KK11RR durch Einfügen weiterer Mutationen wieder erleichtert und analysiert, welche Auswirkungen dies auf die Interaktion mit GPCRs hat. Einerseits wurden hierfür die Aminosäuren E389 und D390 im C-Terminus durch Alanine ausgetauscht (ED389AA), da diese hauptsächlich mit den beiden Argininen in Position 11 und 12 interagieren, und andererseits das Arginin 170 gegen Glutamat

ausgetauscht (R170E), wodurch das *polar core* des Arrestins zerstört wird, sodass dieses leichter aktiviert werden kann (Cervera *et al.*, 2002).

Mittels FRAP-Messungen wurde die Stabilität von Komplexen zwischen dem β_2V_2R und den resultierenden Mehrfachmutanten Arr3 KK11RR R170E und Arr3 KK11RR ED389AA gegenüber Arr3 WT und Arr3 KK11RR verglichen. Da die Fluoreszenz von Arr3 KK11RR in etwa doppelt so stark zurückkehrte wie die von Arr3 WT und dem β_2V_2R , bildete Arr3 KK11RR mit dem β_2V_2R folglich nur transiente Komplexe, wohingegen Arr3 WT vermutlich dauerhaft am Rezeptor gebunden blieb und nur in Form von stabilen Rezeptor-Arrestin-Komplexen in der Membran diffundierte. Die Kombination von KK11RR mit den zusätzlichen Mutationen ED389AA bzw. R170E führte dagegen wieder zu einer stabilen Bindung der Mutanten an den β_2V_2R . Analog dazu wurden Arr3 KK11RR R170E und Arr3 KK11RR ED389AA mit dem β_2AR -SSS, dem β_2V_2R und dem PTHR wieder wie Arr3 WT in Endosomen transportiert, wohingegen Arr3 KK11RR an der Membran verblieb. Arr3 KK11RR ED389AA war auch nach der Stimulation von zwei weiteren Klasse-B-Rezeptoren, dem V_2R und AT_1R , in Endosomen zu finden, wie die Colokalisation mit dem endosomalen Markerprotein EEA1 zeigte, während die ursprüngliche Mutante Arr3 KK11RR in dieser Arbeit mit keinem der beiden Rezeptoren internalisiert wurde. Im Gegensatz dazu war von Shenoy und Lefkowitz (2005) jedoch publiziert worden, dass die Co-Internalisierung von Arr3 KK11RR mit dem V_2R durch den Austausch der beiden Lysine nicht beeinträchtigt war. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden, obwohl die Zellen wie bei Shenoy und Lefkowitz (2005) vor der Agonistapplikation in serumfreiem Medium gehalten wurden und keine GRK2 co-transfiziert wurde. Da die inaktive Konformation von Arr3 KK11RR durch intramolekulare Wechselwirkungen stärker stabilisiert wird als Wildtyp-Arrestin, ist zur vollständigen Aktivierung der Mutante vermutlich eine stärkere Phosphorylierung des Rezeptors nötig. Es ist daher denkbar, dass in den Experimenten von Shenoy und Lefkowitz (2005) durch eine intensivere Phosphorylierung des GPCRs stabilere Komplexe zwischen Arr3 KK11RR und dem V_2R gebildet werden konnten, die gemeinsam in Endosomen transportiert wurden. Zwar wurde in dieser Arbeit trotz Co-Transfektion einer GPCR-Kinase keine Co-Internalisierung von Arr3 KK11RR mit dem V_2R beobachtet, doch eine stärkere Phosphorylierung der Rezeptoren kann bei Shenoy und Lefkowitz (2005) nicht ausgeschlossen werden. Da der tatsächliche Phosphorylierungsgrad der Rezeptoren in den Zellen nicht bestimmt wurde, kann keine klare Aussage über die Phosphorylierungslevel getroffen werden.

Da Arr3 KK11RR nach der Stimulation des AT_1R eine für Klasse-B-Rezeptoren untypische transiente Ubiquitinierung aufwies, wurde postuliert, dass durch den Austausch der beiden Lysine keine stabile Ubiquitinierung Arrestins mehr möglich sei, da die Lysine 11 und 12 nicht mehr als Akzeptoren für Ubiquitin zur Verfügung stünden (Shenoy und Lefkowitz, 2005). Durch die Kombination von KK11RR mit den Mutationen R170E oder ED389AA konnte in dieser Arbeit jedoch bei beiden Mehrfachmutanten (Arr3 KK11RR R170E und Arr3 KK11RR ED389AA) nach 60-minütiger Stimulation des PTHR eine starke Ubiquitinierung festgestellt werden, die der von Wildtyp-Arrestin entsprach. Die verringerte Ubiquitinierung von Arr3 KK11RR ist daher ver-

mutlich nur darauf zurückzuführen, dass die Mutante weniger gut aktiviert werden kann. Werden die intramolekularen Wechselwirkungen, die den basalen Zustand Arrestins stabilisieren, unterbunden (in Arr3 KK11RR ED389AA) oder zusätzlich eine aktivierende Mutation eingefügt (in Arr3 KK11RR R170E), können diese Arrestin-3-Varianten nicht nur wieder stabile Komplexe mit Klasse-B-Rezeptoren bilden, sondern weisen nach der Stimulation eines solchen GPCRs auch wieder die typische langanhaltende Ubiquitinierung auf. Die Lysinreste 11 und 12 sind hierbei als Ubiquitinierungsstellen nicht erforderlich. Angesichts der Tatsache, dass diese beiden Lysine eine wichtige Rolle bei der Bindung des phosphorylierten Rezeptor-C-Terminus spielen (Zhou *et al.*, 2017, Yin *et al.*, 2019, Staus *et al.*, 2020, Huang *et al.*, 2020), ist eine posttranslationale Modifikation der beiden Aminosäuren mit den recht großen Ubiquitinresten ohne eine Beeinträchtigung der Interaktion zwischen Arrestin und dem GPCR auch nur schwer vorstellbar (Abb. 5.2).

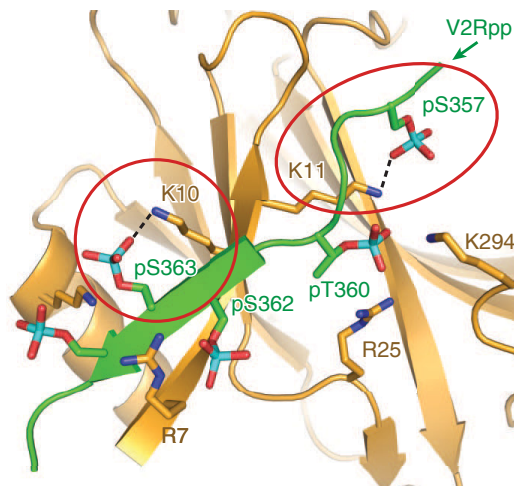


Abbildung 5.2 | Ausschnitt der Kristallstruktur von Arrestin-2 im Komplex mit V₂Rpp

Die Lysine 10 und 11 in Arr2 (gold), die in Arrestin-3 den Positionen 11 und 12 entsprechen, sind wichtig für die Bindung von Phosphatresten im C-Terminus eines Rezeptors (grün). (Abbildung verändert nach Shukla *et al.*, 2013.)

Zusammengefasst beruht die schwächere Bindung von Arr3 KK11RR an Klasse-B-Rezeptoren und auch die transiente Ubiquitinierung dieser Mutante somit nicht auf dem Verlust von zwei essentiellen Ubiquitinierungsstellen, sondern auf der Stabilisierung der inaktiven Konformation durch intramolekulare Wechselwirkungen mit dem autoinhibitorischen C-Terminus des Arrestins.

5.2.2 | Identifikation weiterer Ubiquitinierungsstellen, die die Co-Internalisierung mit GPCRs beeinflussen

Mittels Immunopräzipitation konnte auch in dieser Arbeit dokumentiert werden, dass Arrestin-3 nach der Stimulation eines Klasse-A-Rezeptors nur verhältnismäßig schwach und für kurze Zeit ubiquitiniert wird, während die Aktivierung eines Klasse-B-Rezeptors zu einer starken Ubiquitinierung führt, die mit zunehmender Dauer der Agonistinkubation weiter zunimmt. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten, die unter anderem von Shenoy und Lefkowitz (2003) publiziert worden waren. Aufgrund der Tatsache, dass die stabile Fusion von Ubiquitin an Arrestin (Shenoy und Lefkowitz, 2003) beziehungsweise die Verhinderung der Ubiquitinierung durch den Austausch aller Lysine gegen Arginine (Shenoy *et al.*, 2007) das Klasse-A- und Klasse-B-Verhalten von GPCRs umkehren kann, postulierten die Autoren zudem, dass die stabile Ubiquitinierung des Arrestins durch Klasse-B-Rezeptoren die Voraussetzung für die Internalisierung von Arrestin ist.

Um den Zusammenhang zwischen der Ubiquitinierung Arrestins und seiner Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren zu verifizieren, wurden zunächst alle Lysinreste in Arrestin-3 gegen Arginine ausgetauscht (Arr3 noK). In früheren *in vitro*-Studien hatte diese Mutante keine Einschränkung in ihrer Interaktion mit dem β_2 AR gezeigt (Shenoy *et al.*, 2007). In FRET-Messungen zwischen Arr3 noK und verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren (β_2 AR-SSS, β_2 V₂R und PTHR) wurde jedoch deutlich, dass der Austausch aller Lysine die Rekrutierung von Arrestin-3 in zellulärer Umgebung fast vollständig verhindert. Zwar wird die Ladung der positiven Reste bei der konservativen Mutation von Lysin zu Arginin nicht verändert, jedoch ist die Guanidinogruppe des Arginins deutlich größer als die primäre Aminogruppe des Lysins, was die Interaktion mit den Phosphatresten eines Rezeptors und damit die Bindung des Arrestins an einen Rezeptor beeinträchtigen könnte. Aufgrund der deutlich reduzierten Interaktion mit den GPCRs ist es auch nicht verwunderlich, dass Arr3 noK nicht mit Klasse-B-Rezeptoren in Endosomen transportiert wurde. Es bleibt jedoch fraglich, ob dies wirklich auf der verhinderten Ubiquitinierung des Arrestins beruht, wie von Shenoy *et al.* (2007) postuliert wurde, oder ob nicht vielmehr die sehr schwache Interaktion der Arrestin-Mutante mit dem Rezeptor die Ursache hierfür ist.

Da die Funktionalität von Arrestin noK also stark eingeschränkt war, wurden im nächsten Teil der Arbeit stattdessen einzelne Lysine ausgetauscht, die nachweislich durch Ubiquitin modifiziert werden können. Um herauszufinden, welche Lysine nach der Stimulation eines Klasse-B-Rezeptors ubiquitiniert werden, wurde zunächst mittels massenspektrometrischer Untersuchungen versucht, die Ubiquitinierungsstellen von Arrestin-3 zu identifizieren. Auch wenn dabei ein ubiquitiniertes Lysinrest (K178) erfasst werden konnte, wurden nur elf der 33 Lysinreste im bovinen Arrestin-3 wiedergefunden, sodass über die restlichen 22 Lysine keine Aussage getroffen werden konnte (siehe Kap. 4.1.2.3). Die Mutation von K178 zu Arginin hatte jedoch weder einen Einfluss auf die agonistinduzierte Rekrutierung der Arrestin-Mutante, noch auf ihre Co-Internalisierung mit dem PTHR. Lediglich die Ubiquitinierung von Arr3 K178R war gegenüber Arr3 WT um ca. 25 % reduziert, was bestätigte, dass K178 tatsächlich für die Ubiquitinierung des Arrestins wich-

tig ist, auch wenn es nicht als alleinige Ubiquitinierungsstelle dient. Zudem konnte gezeigt werden, dass Arr3 K178R durch die reduzierte Ubiquitinierung eine höhere Proteinstabilität aufwies.

Da offensichtlich weitere Lysinreste in Arrestin-3 nach der Stimulation des PTHR ubiquitiniert werden, wurden anhand einer Literaturrecherche von Proteomanalysen weitere Ubiquitinierungsstellen identifiziert und sieben weitere Arrestin-Mutanten erstellt, in denen jeweils eine einzelne Ubiquitinierungsstelle eliminiert wurde. Diese Arrestine zeigten ebenfalls keine Beeinträchtigung in ihrer Rekrutierung zum β_2V_2R . Alle Lysin-zu-Arginin-Einzelmutanten wurden auch weiterhin mit dem PTHR in Endosomen transportiert, woraus abgeleitet werden kann, dass die Elimination einzelner Ubiquitinierungsstellen die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren nicht stört. Zudem wurde jede Arrestin-3-Mutante weiterhin ubiquitiniert, wobei das Ubiquitinierungslevel von zwei Mutanten (Arr3 K293R und Arr3 K295R) etwa dem von Wildtyp-Arrestin entsprach, wohingegen das Ubiquitinierungslevel der anderen Mutanten um etwa 20–30 % reduziert war.

Da die Elimination einzelner Ubiquitinierungsstellen somit keine Auswirkung auf die Co-Internalisierung von Arrestin-3 hatte, wurde als nächstes eine Arrestin-Mehrfachmutante mit allen acht untersuchten Lysin-zu-Arginin-Mutationen erstellt (Arr3 8K→R). Die Kombination dieser Mutationen beeinträchtigte die Co-Internalisierung mit dem PTHR tatsächlich, wobei Arr3 8K→R nur in manchen Zellen mit dem Rezeptor colokalisierte, während der Rezeptor in anderen Zellen alleine in Endosomen aufgenommen wurde. Dieser variable Phänotyp wurde auch durch längere Stimulation der Rezeptoren vor der Analyse der Lokalisation oder der Applikation höherer Agonistkonzentrationen nicht beeinflusst. Eine unterschiedliche Behandlung der beiden Gruppen kann außerdem ausgeschlossen werden, da die entsprechenden Zellen oft direkt nebeneinander auf den untersuchten Deckgläsern lagen. Mit der gleichzeitig analysierten Mutante Arr3 6K→R, bei der die Lysine 293 und 295, die keine reduzierte Ubiquitinierung von Arrestin-3 ausgelöst hatten, nicht mutiert worden waren, lag der Anteil der Zellen, in denen Arrestin nicht mit dem PTHR co-internalisierte, etwas höher als bei Arr3 8K→R. Daher wurde die Zahl der Lysin-zu-Arginin-Mutationen anschließend schrittweise reduziert und nur diejenigen Mutanten näher untersucht, die weiterhin nicht mit Klasse-B-Rezeptoren co-internalisierten, um die Lysinreste einzugrenzen, die mindestens nötig sind, um die Internalisierung von Arrestin-3 zu beeinträchtigen. Auch die Vierfachmutante Arr3 4K→R mit den Mutationen K50R, K108R, K153R und K178R konnte mit den Klasse-B-Rezeptoren nicht mehr im gleichen Ausmaß wie Wildtyp-Arrestin internalisieren, sodass die vier Lysin-zu-Arginin-Mutationen als nächstes in allen möglichen Zusammenstellungen in vier Dreifachmutanten kombiniert wurden. Von diesen zeigten nur noch zwei eine reduzierte Co-Internalisierung mit dem PTHR, wohingegen die anderen beiden wieder fast im gleichen Ausmaß wie Arr3 WT in die Zelle aufgenommen wurden. Diejenigen Punktmutationen, die die beiden Mutanten gemeinsam hatten, die nicht mehr internalisieren konnten (K108R und K178R), wurden ebenfalls noch einmal kombiniert und die Auswirkung auf das Internalisierungsverhalten von Arrestin überprüft. Da die Doppelmutante Arr3 K108R K178R mit den meisten untersuch-

ten Rezeptoren so gut wie keine Internalisierung mehr zeigte, spielen diese Lysinreste gemeinsam höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Co-Internalisierung des Arrestins. Andere Kombinationen, in denen nicht beide Lysine gleichzeitig mutiert wurden, führten stattdessen wieder zu einer ungestörten Internalisierung der betreffenden Arrestin-Mutanten (z.B. die Dreifachmutanten Arr3 K50R K108R K153R oder Arr3 K50R K153R K178R).

Allerdings wurde nicht mit allen Rezeptoren die Internalisierung der Doppelmutante Arr3 K108R K178R konsequent verhindert. Mit den beiden artifiziellen GPCRs β_2 AR-SSS und β_2 V₂R, die auf dem Klasse-A-Rezeptor β_2 AR basieren und durch Veränderungen des C-Terminus erstellt wurden, ergab sich ein sehr variabler Phänotyp mit breiten Schwankungen des Pearson-Korrelationskoeffizienten. Dies weist auf eine gewisse Rezeptorspezifität bei den Lysinresten in Arrestin-3 hin, die für eine Internalisierung mit GPCRs vorhanden sein müssen, hin. Da sich der V₂R, dessen C-Terminus für die Klonierung des β_2 V₂R verwendet wurde, hierbei anders verhält als der chimäre β_2 V₂R, spielt möglicherweise auch der intrazelluläre Bereich der transmembranären Helices des GPCRs oder die relative Orientierung des C-Terminus zum Transmembranbereich des Rezeptors eine Rolle bei der Co-Internalisierung von Arrestin-3.

Weiterhin bleibt unklar, warum Arrestin-3 zumindest in manchen Zellen wieder mit Klasse-B-Rezeptoren internalisieren kann, wenn mehr Lysine als K108 und K178 entfernt wurden, wie es z.B. mit Arr3 4K→R und Arr3 6K→R der Fall war. Zwar sind Kompensationsmechanismen wie die Ubiquitinierung anderer verfügbarer Lysinreste durchaus möglich, warum diese jedoch erst bei einer größeren Anzahl an Mutationen einsetzen, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Die Internalisierung von Arrestin-3 mit Klasse-B-Rezeptoren wurde oft auf eine höhere Affinität des Arrestins zu diesen GPCRs zurückgeführt (Oakley *et al.*, 1999, Zindel, 2015). Da die Elimination der Lysinreste 108 und 178 die Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren meist vollständig verhinderte und auch andere Arrestine mit mehr Punktmutationen eine teilweise reduzierte Aufnahme in die Zelle aufwiesen (z.B. Arr3 4K→R und Arr3 6K→R), wurden diese Mutanten in FRAP-Experimenten untersucht. Da die Fluoreszenzwiederkehr der Arrestine in diesen Experimenten davon abhängt, wie schnell diese von den quervernetzten Rezeptoren dissoziieren und neues, fluoreszierendes Arrestin gebunden wird, lässt sich hierdurch die Stabilität der Komplexe zwischen aktivierten Rezeptoren und Arrestin einschätzen. In diesen Experimenten wurde jedoch für keine der untersuchten Arrestin-Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp beschleunigte Austauschrate am β_2 AR-SSS beobachtet. Die reduzierte Co-Internalisierung der Lysin-zu-Arginin-Mutanten kann also nicht auf eine weniger stabile Bindung am Rezeptor zurückgeführt werden. Vermutlich entscheiden daher neben der Komplexstabilität zusätzlich weitere Faktoren darüber, ob Arrestin mit dem Rezeptor in Endosomen aufgenommen wird, die von den hier untersuchten Arrestin-Mutanten nicht erfüllt wurden. Da alle in dieser Arbeit adressierten Lysinreste nachgewiesene Ubiquitinierungsstellen des Arrestins sind, ist es naheliegend, dass die Co-Internalisierung durch die Ubiquitinierung dieser Stellen reguliert wird.

Von den beiden Lysinen 108 und 178, die nach den Ergebnissen dieser Arbeit in Arrestin-3 vorhanden sein müssen, damit die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren stattfinden kann, befindet sich der Lysinrest 108 in Arrestin-3 in der α -Helix am Rand der N-Domäne und ist in allen Arrestin-Isoformen konserviert. Das entsprechende Lysin in Arrestin-2 (K107) ist an der Bindung von Phosphatresten im Rezeptor-C-Terminus beteiligt, wie die Struktur des Arrestins mit einem vollständig phosphorylierten Peptid des V₂R-C-Terminus demonstrierte (Shukla *et al.*, 2013). Die Mutation des Lysins 108 in Arrestin-3 zu Arginin hatte jedoch keine Auswirkung auf die Rekrutierung der Arrestin-Mutanten durch GPCRs bzw. auf die Stabilität von Arrestin-Rezeptor-Komplexen, sodass eine Beeinträchtigung der Bindung an Rezeptoren ausgeschlossen werden kann. Einzig für die Internalisierung von Arrestin-3 scheint an dieser Position ein Lysinrest statt eines Arginins benötigt zu werden. Da dieser Lysinrest hauptsächlich an der Bindung des distalsten Phosphatrestes eines Rezeptor-C-Terminus beteiligt ist, wäre es prinzipiell vorstellbar, dass an dieser Stelle genug Spielraum besteht, damit das Lysin 108 in Arrestin-3 trotzdem als Ubiquitinierungsstelle zur Verfügung steht. In den für diese Arbeit durchgeführten MS-Experimenten konnte K108 leider nicht wiedergefunden werden, sodass keine Aussage dazu getroffen werden kann, ob der Lysinrest unter den experimentellen Bedingungen, die in dieser Arbeit vorherrschten, ubiquitiniert wird. Es ist jedoch auch möglich, dass die Mutation des Lysins 108 zu Arginin die Interaktion mit dem GPCR doch beeinträchtigt und verhindert, dass Klasse-B-Rezeptoren eine Konformation der Arrestin-Mutante induzieren, die für die Co-Internalisierung nötig ist.

Das Lysin 178 in Arrestin-3 liegt dagegen in der flexiblen Gelenkregion zwischen der N- und C-Domäne des Proteins und ist auch während der Bindung an einen Rezeptor für modifizierende Enzyme wie Ubiquitinligasen zugänglich. Dieser Lysinrest ist nicht konserviert und kommt beispielsweise in humanem und dem in dieser Arbeit verwendeten bovinen Arrestin-3 vor, wohingegen im Arrestin-3 verschiedener Nagetierarten (z.B. der Maus) an der entsprechenden Stelle ein Threonin liegt. Khoury *et al.* (2014) konnten zeigen, dass T178 in murinem Arrestin-3 als Phosphorylierungsstelle eine wichtige Rolle für die Stabilität endosomaler Komplexe zwischen Arrestin-3 und verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren spielt. Außerdem erhöhte eine phosphomimetische Mutation des Threonins zu Aspartat die Stabilität dieser Komplexe deutlich und führte sogar zur Internalisierung der Arrestin-Mutante mit dem Klasse-A-Rezeptor β_2 AR. Es ist daher plausibel, dass die entsprechende Position in der Gelenkregion auch im humanen oder bovinen Arrestins an der Regulation endosomaler Rezeptor-Arrestin-Komplexe beteiligt ist, auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus aufgrund des Lysins anstelle eines Threonins ein anderer sein muss. Da in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass das Lysin 178 nach der Stimulation eines Klasse-B-Rezeptors ubiquitiniert wird, ist es naheliegend, dass diese posttranslationale Modifikation dabei relevant ist.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die gleichzeitige Elimination mehrerer Ubiquitinierungsstellen in Arrestin-3 die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren reduzieren kann. Der größte Effekt wurde hierbei erzielt, wenn nur die beiden Lysinreste 108 und 178 gemeinsam

mutiert wurden, da Arr3 K108R K178R mit den untersuchten Klasse-B-Rezeptoren kaum noch in Endosomen transportiert wurde. Diese Lysinreste spielen somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Co-Internalisierung von Arrestin-3, die möglicherweise auf ihrer Funktion als Ubiquitin-Akzeptorstellen beruht. Zumindest für das Lysin 178 wurde nachgewiesen, dass es nach der Stimulation eines Klasse-B-Rezeptors ubiquitiniert wird. Zudem wies Arr3 K108R K178R ein signifikant niedrigeres Ubiquitinierungslevel von nur ca. 50 % des Wildtyp-Arrestins auf.

5.2.3 | Untersuchung von Inhibitoren posttranslationaler Modifikationen

Da die Beseitigung von Ubiquitinierungsstellen in Arrestin-3 die Co-Internalisierung mit GPCRs deutlich einschränkte, wurde durch die Inhibierung der Ubiquitinierungskaskade mittels eines Hemmstoffs der E1-Ligase Uba1 untersucht, ob die reduzierte Internalisierung der Lysin-zu-Arginin-Mutanten tatsächlich auf der fehlenden Ubiquitinierung beruhte. Die E1-Ligase Uba1 aktiviert den Großteil des Ubiquitins (~ 99%), das anschließend auf andere Proteine übertragen werden kann. Tatsächlich wurde durch TAK-243 sowohl die gesamte zelluläre Ubiquitinierung als auch die Ubiquitinierung von Arrestin-3 signifikant reduziert. Trotzdem zeigte der einzige Western Blot, der zur Beurteilung der Ubiquitinierung von Arrestin herangezogen werden kann, nach Inkubation mit TAK-243 weiterhin eine Bande, die auf monoubiquitiniertes Arrestin-3 hindeutet. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass Arrestin-3 auch über Uba1-unabhängige Enzymkaskaden mit Ubiquitin modifiziert werden kann. Bislang konnte zwar gezeigt werden, dass Arrestin-3 mit mehreren E3-Ligasen interagiert, doch nur für Mdm2 wurde gezeigt, dass Arrestin durch diese Ligase auch ubiquitiniert wird (Kommaddi und Shenoy, 2013). Leider konnte in dieser Arbeit über die Lokalisation von p53 und Mdm2 nicht nachgewiesen werden, ob die Ubiquitinligase ihre Substratproteine trotz Applikation des Inhibitors weiterhin ubiquitinieren kann. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise, dass Mdm2 auch mit der E2-Ligase Ube2z (auch als Use1 bezeichnet) interagieren kann (van Wijk *et al.*, 2009), die üblicherweise von der zweiten, weniger bedeutenden E1-Ligase Uba6 mit Ubiquitin beladen wird (Jin *et al.*, 2007). Außerdem wurde dokumentiert, dass Mdm2 das Tumorsuppressorprotein p53 *in vitro* auch dann ubiquitiniert, wenn nur Uba6 zur Aktivierung von Ubiquitin zur Verfügung steht (Pelzer *et al.*, 2007). Dies deutet darauf hin, dass Mdm2 auch an Uba1-unabhängigen Ubiquitinierungskaskaden beteiligt ist, die von TAK-243 nicht beeinträchtigt werden. Es erscheint somit plausibel, dass Arrestin-3 auch nach der Applikation des Uba1-Inhibitors zumindest teilweise durch Mdm2 ubiquitiniert wird. Trotz des weitestgehenden Verlusts der Ubiquitinierung von Arrestin-3 durch Inkubation der Zellen mit TAK-243 wurde dieses nach der Stimulation des PTHR weiterhin ins Zellinnere aufgenommen. Dies weist darauf hin, dass die Ubiquitinierung von Arrestin-3 alleine nicht für die Co-Internalisierung mit Klasse-B-Rezeptoren verantwortlich ist. Um zu überprüfen, ob die Internalisierung Arrestins durch eine restlose Verhinderung der Ubiquitinierung vollständig unterbunden werden kann, könnten zukünftig weitere Inhibitoren, z.B. für Uba6 oder Mdm2 herangezogen werden.

Zusätzlich wurde auch ein Inhibitor der einzigen bekannten E2-Ligase für SUMO-Proteine, Ubc9, verwendet, um die Auswirkung der SUMOylierung von Arrestin-3 auf die Internalisierung zu untersuchen. Die beiden wichtigsten Lysinreste 108 und 178 in Arrestin-3 liegen zwar nicht in einer Konsensussequenz, die von Ubc9 erkannt und modifiziert wird (vgl. Kap. 1.2.4.2), jedoch ist unter Vermittlung von E3-Ligasen auch die SUMOylierung an anderen Stellen möglich. Es wäre daher denkbar, dass die Lysine als Akzeptoren für SUMO dienen und so die Internalisierung von Arrestin regulieren. Konfokale Aufnahmen zeigten jedoch, dass die Internalisierung von Arrestin-3 mit dem PTHR durch die Inkubation der Zellen für unterschiedliche Zeiträume und mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors 2-D08 nicht verhindert werden konnte. Es sollte jedoch zukünftig überprüft werden, ob der Inhibitor die zelluläre SUMOylierung und vor allem die SUMOylierung von Arrestin-3 unter diesen Bedingungen ausreichend stark hemmt und die Internalisierungsexperimente sollten gegebenenfalls mit angepasster Konzentration und Inkubationsdauer wiederholt werden.

5.2.4 | Fazit

Insgesamt konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit verschiedenen Klasse-B-Rezeptoren durch die Elimination mehrerer Ubiquitinierungsstellen verhindert werden kann. Da die Interaktion mit GPCRs in FRET- oder FRAP-Messungen durch die eingefügten Mutationen nicht beeinträchtigt wurde, ist es wahrscheinlich, dass die posttranslationale Modifikation der deletierten Lysine in Arr3 K108R K178R mit Ubiquitin essentiell für die Co-Internalisierung mit GPCRs ist. Im Gegensatz dazu konnte für Arr3 KK11RR gezeigt werden, dass die reduzierte Internalisierung der Mutante sowie ihre geringere Affinität zu Rezeptoren auf der Stabilisierung der inaktiven Konformation des Arrestins beruhte. Durch das Einfügen zusätzlicher destabilisierender Mutationen konnten Arr3 KK11RR ED389AA oder Arr3 KK11RR R170E so wieder in die Zelle aufgenommen werden, obwohl die Proteine nach wie vor nicht in Position 11 und 12 ubiquitiniert werden konnten. Diese bisher postulierten Ubiquitinierungsstellen sind daher nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht relevant für die Co-Internalisierung von Arrestin.

Die Experimente mit dem Ubiquitinierungsinhibitor TAK-243, der die Ubiquitinierung von Arrestin-3 zu einem Großteil verhinderte und dennoch keinen Einfluss auf die Co-Internalisierung mit GPCRs hatte, weisen jedoch darauf hin, dass die Ubiquitinierung möglicherweise nicht alleine für das unterschiedliche Verhalten Arrestins mit Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren verantwortlich ist. Neben der in dieser Arbeit untersuchten Ubiquitinierung spezifischer Stellen des Arrestins spielt vermutlich auch eine höhere Affinität des Arrestins zu diesen Rezeptoren (Oakley *et al.*, 2000, Zindel, 2015), sowie eine spezielle Konformation von Arrestin-3, die durch Klasse-B-Rezeptoren induziert wird (Lee *et al.*, 2016), eine Rolle für die Co-Internalisierung des Arrestins.

5.3 | Einfluss von Agonisten mit verschiedenen Bindungshalbwertszeiten auf die Internalisierung

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Interaktion zwischen Arrestin-3 und dem μ OR nach der Stimulation des Rezeptors mit verschiedenen Agonisten mit unterschiedlichen Methoden untersucht. In den FRET-Messungen wurde gezeigt, dass Liganden mit langen Bindungshalbwertszeiten zu einer deutlich langsameren Dissoziation des Arrestins vom Rezeptor führen. Im Gegensatz dazu wurde die Stabilität der Rezeptor-Arrestin-Komplexe bei kontinuierlicher Anwesenheit des Agonisten nicht durch die Affinität des Liganden beeinflusst. Des Weiteren resultierte die Stimulation des μ ORs oder β_2 ARs mit Agonisten, die sehr lange am Rezeptor gebunden bleiben, nicht in einer ebenso stabilen Bindung des Arrestins am Rezeptor, da keiner der Agonisten die Internalisierung von Arrestin-3 mit den Klasse-A-Rezeptoren induzieren konnte.

In den FRET-Messungen wird die Dissoziation des Arrestins durch das Auswaschen des Agonisten hervorgerufen, wobei der Rezeptor wieder in seinen inaktiven Zustand übergeht. Durch diese Konformationsänderung löst sich auch das Arrestin-3 vom Rezeptor, sodass die Dissoziationskinetik des Arrestins auch von der Bindungshalbwertszeit des Liganden abhängt. In den FRAP-Experimenten ist der Agonist dagegen permanent anwesend, sodass der Rezeptor dauerhaft in seiner aktivierten Konformation bleibt. Auf diese Weise konnte die Stabilität der Rezeptor-Arrestin-Komplexe ohne den störenden Einfluss der Dissoziationshalbwertszeit des Agonisten untersucht werden. Während die Agonisten mit längerer Bindungshalbwertszeit wie erwartet zu einer langsameren Dissoziation des Arrestins vom Rezeptor führten, ergab sich in den FRAP-Messungen, bei denen der Austausch geblichener und fluoreszierender Arrestine am Rezeptor beobachtet wurde, kein Unterschied in der Stabilität der Rezeptor-Arrestin-Komplexe. Für diese Experimente wurde der funktionell selektive Ligand SR17018 verwendet, der hauptsächlich G-Protein-vermittelte Signalwege aktiviert (Schmid *et al.*, 2017). Wie in dieser Arbeit sowie von Gillis *et al.* (2020) gezeigt wurde, führt die Aktivierung des Rezeptors mit SR17018 bei Überexpression der GRK2 jedoch zu einer robusten Rekrutierung von Arrestin-3. Von Etorphin war bisher publiziert, dass dieser Agonist zu einer fast irreversiblen Bindung von Arrestin führt, die trotz Auswaschen des Liganden über einen Zeitraum von mehreren Minuten stabil bleibt (McPherson *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte jedoch während des Auswaschens von Etorphin eine Dissoziation des Arrestins vom μ OR beobachtet werden, was möglicherweise darauf beruht, dass McPherson *et al.* (2010) eine zehnfach höhere Konzentration des Liganden einsetzten, die in der Auswaschphase eventuell nicht vollständig entfernt werden konnte. Der partielle Agonist Morphin induziert dagegen keine robuste Membrantranslokation von Arrestin-3 (Zhang *et al.*, 1998) und wurde aus diesem Grund in dieser Arbeit nicht für FRAP-Experimente verwendet.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Klasse-A-Rezeptoren, wie der β_2 AR oder μ OR, ihr Verhalten durch die Verwendung von Agonisten mit besonders langer Bindungsdauer nicht zu Klasse B verändern. Die Ergebnisse anderer Studien deuten darauf hin, dass stattdessen die

Anzahl und Anordnung von Phosphatresten im C-Terminus des GPCRs dafür nötig sind, dass Arrestin stärker an einen Rezeptor bindet und mit diesem internalisiert wird (Zindel *et al.*, 2015, 2016, Zhou *et al.*, 2017, Mayer *et al.*, 2019). Da alle in dieser Arbeit verwendeten μ OR-Agonisten die gleichen Phosphorylierungsmuster induzieren (Just *et al.*, 2013, Gillis *et al.*, 2020), konnten auch in den FRAP-Messungen keine Unterschiede in der Stabilität der Rezeptor-Arrestin-Komplexe dokumentiert werden.

Die FRAP-Experimente verdeutlichen zudem, dass Arrestin-3 von einem aktivierten GPCR abdissoziieren kann, statt fest daran gebunden zu bleiben. Da die Fluoreszenzwiederkehr von Arrestin-3 deutlich schneller war als die der immobilisierten Rezeptoren, resultierte die Wiederkehr der Arrestine nicht aus der lateralen Diffusion stabiler Rezeptor-Arrestin-Komplexe, sondern aus der Dissoziation der geblichenen Proteine vom Rezeptor und der nachfolgenden Reassoziation von fluoreszierendem Arrestin. Untersuchungen am ternären Komplex aus Agonist, Rezeptor und Arrestin könnten vermuten lassen, dass nicht nur die Bindung von Arrestin am Rezeptor die Affinität des Liganden erhöht (Gurevich *et al.*, 1997), sondern umgekehrt auch Agonisten mit besonders hoher Affinität zu einer stabileren Bindung des Arrestins am Rezeptor führen könnte. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch, dass die Aktivierung des Rezeptors mit einem Agonisten, der besonders lange gebunden bleibt, nicht zu einer besonders stabilen Bindung des Arrestins an den GPCR führt, sodass die Rezeptorbindung von Arrestin durch die Affinität des Agonisten nicht beeinflusst werden kann.

Zusammengefasst zeigt dieser Teil der Arbeit, dass die Bindungshalbwertszeit eines Liganden die Interaktionen zwischen Rezeptor und Arrestin-3 nicht beeinflusst und sich Klasse-A-Rezeptoren nicht durch Agonisten mit besonders langer Bindungsdauer in Klasse B umwandeln lassen.

Literaturverzeichnis

- Ahn, Seungkirl, Sudha K. Shenoy, Huijun Wei, and Robert J. Lefkowitz. 2004. "Differential Kinetic and Spatial Patterns of β -Arrestin and G Protein-Mediated ERK Activation by the Angiotensin II Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 279(34):35518–25.
- Akimov, Vyacheslav, Louise C. B. Olsen, Sten V. F. Hansen, Inigo Barrio-Hernandez, Michele Puglia, Søren S. Jensen, Ilia A. Solov'Yov, Irina Kratchmarova, and Blagoy Blagoev. 2018. "StUbEx PLUS - A Modified Stable Tagged Ubiquitin Exchange System for Peptide Level Purification and In-Depth Mapping of Ubiquitination Sites." *Journal of Proteome Research* 17(1):296–304.
- Al-Zamel, Noura, Suleiman Al-Sabah, Yunus Luqmani, Lobna Adi, Siby Chacko, Tom Dario Schneider, and Cornelius Krasel. 2020. "A Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist Does Not Antagonize Glucagon at Its Receptor but May Act as a Biased Agonist at the GLP-1 Receptor." *International Journal of Molecular Sciences* 21(9):3357.
- Alexander, Stephen P. H., Arthur Christopoulos, Anthony P. Davenport, Eamonn Kelly, Alistair Mathie, John A. Peters, Emma L. Veale, Jane F. Armstrong, Elena Faccenda, Simon D. Harding, Adam J. Pawson, Joanna L. Sharman, Christopher Southan, Jamie A. Davies, and CGTP Collaborators. 2019. "THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G Protein-Coupled Receptors." *British Journal of Pharmacology* 176(S1):S21–141.
- Allen, Andrew M., Jialong Zhuo, and Frederick A. O. Mendelsohn. 2000. "Localization and Function of Angiotensin AT1 Receptors." *American Journal of Hypertension* 13(1):31S–38S.
- Allen, John A. and Bryan L. Roth. 2011. "Strategies to Discover Unexpected Targets for Drugs Active at G Protein-Coupled Receptors." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 51:117–44.
- Apostolakou, Avgi E., Fotis A. Baltoumas, Dimitrios J. Stravopodis, and Vassiliki A. Iconomidou. 2020. "Extended Human G-Protein Coupled Receptor Network: Cell-Type-Specific Analysis of G-Protein Coupled Receptor Signaling Pathways." *Journal of Proteome Research* 19(1):511–24.
- Attramadal, Hhvard, Jeffrey L. Arriz, Chiye Aoki, Ted M. Dawson, Juan Codina, Madan M. Kwatra, Solomon H. Snyder, Marc G. Caron, and Robert J. Lefkowitz. 1992. " β -Arrestin2, a Novel Member of the Arrestin / β -Arrestin Gene Family." *Journal of Biological Chemistry* 267(25):17882–90.
- Bajar, Bryce T., Emily S. Wang, Shu Zhang, Michael Z. Lin, and Jun Chu. 2016. "A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs." *Sensors* 16(9):1488.
- Bergwitz, Clemens and Harald Jüppner. 2010. "Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23." *Annual Review of Medicine* 61:91–104.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* 7(6):1513–23.

- Bourquard, Thomas, Flavie Landomiel, Eric Reiter, Pascale Crépieux, David W. Ritchie, Jérôme Azé, and Anne Poupon. 2015. "Unraveling the Molecular Architecture of a G Protein-Coupled Receptor/ β -Arrestin/Erk Module Complex." *Scientific Reports* 5:10760.
- Boyd, Scott D., Kenneth Y. Tsai, and Tyler Jacks. 2000. "An Intact HDM2 RING-Finger Domain Is Required for Nuclear Exclusion of p53." *Nature Cell Biology* 2(9):563–68.
- Braman, Jeffrey, Carol Papworth, and Alan Greener. 1996. "Site-Directed Mutagenesis Using Double-Stranded Plasmid DNA Templates." *Methods in Molecular Medicine* 57:31–44.
- Bringhurst, F. R., H. Juppner, J. Guo, P. Urena, J. T. Potts Jr, H. M. Kronenberg, A. B. Abou-Samra, and G. V. Segre. 1993. "Peptide Receptors Activate Multiple Messenger Signals and Biological Responses in LLC-PK1." *Society* 132(5).
- Brown, Matthew D. and David B. Sacks. 2009. "Protein Scaffolds in MAP Kinase Signalling." *Cellular Signalling* 21(4):462–69.
- Butcher, Adrian J., Kok Choi Kong, Rudi Prihandoko, and Andrew B. Tobin. 2012. "Physiological Role of G-Protein Coupled Receptor Phosphorylation." *Handbook of Experimental Pharmacology* 208:79–94.
- Butcher, Adrian J., Rudi Prihandoko, Kok Choi Kong, Phillip McWilliams, Jennifer M. Edwards, Andrew Bottrill, Sharad Mistry, and Andrew B. Tobin. 2011. "Differential G-Protein-Coupled Receptor Phosphorylation Provides Evidence for a Signaling Bar Code." *Journal of Biological Chemistry* 286(13):11506–18.
- Bylund, David B. 2007. "Beta-2 Adrenoceptor." in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*.
- Cahill, Thomas J., Alex R. B. Thomsen, Jeffrey T. Tarrasch, Bianca Plouffe, Anthony H. Nguyen, Fan Yang, Li Yin Huang, Alem W. Kahsai, Daniel L. Bassoni, Bryant J. Gavino, Jane E. Lamerdin, Sarah Triest, Arun K. Shukla, Benjamin Berger, John Little, Albert Antar, Adi Blanc, Chang Xiu Qu, Xin Chen, Kouki Kawakami, Asuka Inoue, Junken Aoki, Jan Steyaert, Jin Peng Sun, Michel Bouvier, Georgios Skinotis, and Robert J. Lefkowitz. 2017. "Distinct Conformations of GPCR- β -Arrestin Complexes Mediate Desensitization, Signaling, and Endocytosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(10):2562–67.
- Catt, K. J., F. A. C. Mendelsohn, M. A. Millan, and G. Aguilera. 1984. "The Role of Angiotensin II Receptors in Vascular Regulation." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 6:S575–85.
- Celver, Jeremy, Sergey A. Vishnivetskiy, Charles Chavkin, and Vsevolod V. Gurevich. 2002. "Conservation of the Phosphate-Sensitive Elements in the Arrestin Family of Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 277(11):9043–48.
- Chalfie, Martin, Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W. Ward, and Douglas C. Prasher. 1994. "Green Fluorescent Protein as a Marker Gene Expression." *Science* 263(5148):802–5.

- Chauvin, Stephanie, Margaret Bencsik, T. O. M. Bambino, and Robert A. Nissenson. 2002. "Parathyroid Hormone Receptor Recycling: Role of Receptor Dephosphorylation and β -Arrestin." *Molecular Endocrinology* 16(12):2720–32.
- Chen, Qiuyan, Nicole A. Perry, Sergey A. Vishnivetskiy, Sandra Berndt, Nathaniel C. Gilbert, Ya Zhuo, Prashant K. Singh, Jonas Tholen, Melanie D. Ohi, Eugenia V. Gurevich, Chad A. Brautigam, Candice S. Klug, Vsevolod V. Gurevich, and T. M. Iverson. 2017. "Structural Basis of Arrestin-3 Activation and Signaling." *Nature Communications* 8(1):1427.
- Cherezov, Vadim, Daniel M. Rosenbaum, Michael A. Hanson, Søren G. F. Rasmussen, Sun Thian Foon, Tong Sun Kobilka, Hee Jung Choi, Peter Kuhn, William I. Weis, Brian K. Kobilka, and Raymond C. Stevens. 2007. "High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β 2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor." *Science* 318(5854):1258–65.
- Chung, C. T., Suzanne L. Niemela, and Roger H. Miller. 1989. "One-Step Preparation of Competent Escherichia Coli : Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(7):2172–75.
- Civciristov, Srgjan and Michelle L. Halls. 2019. "Signalling in Response to Sub-Picomolar Concentrations of Active Compounds: Pushing the Boundaries of GPCR Sensitivity." *British Journal of Pharmacology* 176(14):2382–2401.
- Coleman, R. A., S. P. Grix, S. A. Head, J. B. Louttit, A. Mallett, and R. L. G. Sheldrick. 1994. "A Novel Inhibitory Prostanoid Receptor in Piglet Saphenous Vein." *Prostaglandins* 47(2):151–68.
- Congreve, Miles, Chris de Graaf, Nigel A. Swain, and Christopher G. Tate. 2020. "Impact of GPCR Structures on Drug Discovery." *Cell* 181(1):81–91.
- Daaka, Yehia, Louis M. Luttrell, and Robert J. Lefkowitz. 1997. "Switching of the Coupling of the β 2-Adrenergic Receptor to Different g Proteins by Protein Kinase A." *Nature* 390(6655):88–91.
- Datta, Nabanita S. and Abdul B. Abou-Samra. 2009. "PTH and PTHrP Signaling in Osteoblasts." *Cellular Signalling* 21(8):1245–54.
- Delmotte, Philippe, Anna-Rebekka Ressmeyer, Yan Bai, and Michael J. Sanderson. 2010. "Mechanisms of Airway Smooth Muscle Relaxation Induced by Beta2-Adrenergic Agonists." *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 15:750–64.
- Deol, Kirandeep K., Sonja Lorenz, and Eric R. Strieter. 2019. "Enzymatic Logic of Ubiquitin Chain Assembly." *Frontiers in Physiology* 10:835
- DeWire, Scott M., Seungkirl Ahn, Robert J. Lefkowitz, and Sudha K. Shenoy. 2007. " β -Arrestins and Cell Signaling." *Annual Review of Physiology* 69:483–510.
- Dhawan, BN, F. Cesselin, R. Raghbir, T. Reisine, PB Bradley, PS Portoghese, and M. Hamo. 1996. "International Classification Union of Pharmacology XII. Classification of Opioid Receptors." *Pharmacological Reviews* 48(4):567–92.

- Digby, Gregory J., Robert M. Lober, Pooja R. Sethi, and Nevin A. Lambert. 2006. "Some G Protein Heterotrimers Physically Dissociate in Living Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47):17789–94.
- Dobolyi, Arpád, Eugene Dimitrov, Miklós Palkovits, and Ted B. Usdin. 2012. "The Neuroendocrine Functions of the Parathyroid Hormone 2 Receptor." *Frontiers in Endocrinology* 3:121.
- Dogra, Shalini, Chandan Sona, Ajeet Kumar, and Prem N. Yadav. 2016. Tango Assay for Ligand-Induced GPCR- β -Arrestin2 Interaction: Application in Drug Discovery. *Methods in Cell Biology* Vol. 132. Elsevier Ltd.
- Dorsch, Sandra, Karl Norbert Klotz, Stefan Engelhardt, Martin J. Lohse, and Moritz Bünemann. 2009. "Analysis of Receptor Oligomerization by FRAP Microscopy." *Nature Methods* 6(3):225–30.
- Downes, G. B. and N. Gautam. 1999. "The G Protein Subunit Gene Families." *Genomics* 62(3):544–52.
- Dwivedi-Agnihotri, Hemlata, Madhu Chaturvedi, Mithu Baidya, Tomasz Maciej Stepniewski, Shubhi Pandey, Jagannath Maharana, Ashish Srivastava, Natarin Caengprasath, Aylin C. Hanyaloglu, Jana Selent, and Arun K. Shukla. 2020. "Distinct Phosphorylation Sites in a Prototypical GPCR Differently Orchestrate β -Arrestin Interaction, Trafficking, and Signaling." *Science Advances* 6(37):eabb8368.
- Emmerich, Christoph H. and Philip Cohen. 2015. "Optimising Methods for the Preservation, Capture and Identification of Ubiquitin Chains and Ubiquitylated Proteins by Immunoblotting." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 466(1):1–14.
- England, Christopher G., Emily B. Ehlerding, and Weibo Cai. 2016. "NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence." *Bioconjugate Chemistry* 27(5):1175–87.
- Erlandson, Sarah C., Conor McMahon, and Andrew C. Kruse. 2018. "Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Signaling." *Annual Review of Biophysics* 47:1–18.
- Ferguson, S. S., Larry S. Barak, J. Zhang, and M. G. Caron. 1996. "G-Protein-Coupled Receptor Regulation: Role of G-Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 74(10):1095–1110.
- Ferguson, Stephen S. G. 2007. "Phosphorylation-Independent Attenuation of GPCR Signalling." *TRENDS in Pharmacological Sciences* 28(4):179–9
- Flotho, Annette and Frauke Melchior. 2013. "Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease." *Annual Review of Biochemistry* 82:357–85.
- Förster, Th. 1948. "Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz." *Annalen Der Physik* 437(1–2):55–75.

- Fredriksson, Robert, Malin C. Lagerström, Lars Gustav Lundin, and Helgi B. Schiöth. 2003. "The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints." *Molecular Pharmacology* 63(6):1256–72.
- Gardella, Thomas J. and Jean Pierre Vilardaga. 2015. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIII. the Parathyroid Hormone Receptors—Family B G Protein–Coupled Receptors." *Pharmacological Reviews* 67(2):310–37.
- Gareau, Jaclyn R. and Christopher D. Lima. 2010. "The SUMO Pathway: Emerging Mechanisms That Shape Specificity, Conjugation and Recognition." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(12):861–71.
- Gibson, Daniel G., Lei Young, Ray Yuan Chuang, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison, and Hamilton O. Smith. 2009. "Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases." *Nature Methods* 6(5):343–45.
- Gillis, Alexander, Arisbel B. Gondin, Andrea Kliewer, Julie Sanchez, Herman D. Lim, Claudia Alam-ein, Preeti Manandhar, Marina Santiago, Sebastian Fritzwanker, Frank Schmidel, Timothy A. Katte, Tristan Reekie, Natasha L. Grimsey, Michael Kassiou, Barrie Kellam, Cornelius Krasel, Michelle L. Halls, Mark Connor, J. Robert Lane, Stefan Schulz, Macdonald J. Christie, and Meritxell Canals. 2020. "Low Intrinsic Efficacy for G Protein Activation Can Explain the Improved Side Effect Profiles of New Opioid Agonists." *Science Signaling* 13(625):eaaz3140
- Glaaser, Ian W. and Paul A. Slesinger. 2015. Structural Insights into GIRK Channel Function. *International Review of Neurobiology* Vol. 123. 1st ed. Elsevier Inc.
- Goodman, Oscar B. Jr, Jason G. Krupnick, Francesca Santini, Vsevolod V. Gurevich, Raymond B. Penn, Alison W. Gagnon, James H. Keen, and Jeffrey L. Benovic. 1996. "β-Arrestin Acts as a Clathrin Adaptor in Endocytosis of the β2-Adrenergic Receptor." *Nature* 383(6599):447–50.
- Granzin, Joachim, Andreas Stadler, Anneliese Cousin, Ramona Schlesinger, and Renu Batra-Safferling. 2015. "Structural Evidence for the Role of Polar Core Residue Arg175 in Arrestin Activation." *Scientific Reports* 5:15808.
- Grim, Travis W., Cullen L. Schmid, Edward L. Stahl, Fani Pantouli, Jo Hao Ho, Agnes Acevedo-Canabal, Nicole M. Kennedy, Michael D. Cameron, Thomas D. Bannister, and Laura M. Bohn. 2020. "A G Protein Signaling-Biased Agonist at the μ-Opioid Receptor Reverses Morphine Tolerance While Preventing Morphine Withdrawal." *Neuropsychopharmacology* 45(2):416–25.
- Grundmann, Manuel, Nicole Merten, Davide Malfacini, Asuka Inoue, Philip Preis, Katharina Simon, Nelly Rüttiger, Nicole Ziegler, Tobias Benkel, Nina Katharina Schmitt, Satoru Ishida, Ines Müller, Raphael Reher, Kouki Kawakami, Ayumi Inoue, Ulrike Rick, Toni Köhl, Diana Imhof, Junken Aoki, Gabriele M. König, Carsten Hoffmann, Jesus Gomeza, Jürgen Wess, and Evi Kostenis. 2018. "Lack of Beta-Arrestin Signaling in the Absence of Active G Proteins." *Nature Communications* 9(1):341.

- Guo, B., S. H. Yang, J. Witty, and A. D. Sharrocks. 2007. "Signalling Pathways and the Regulation of SUMO Modification." *Biochemical Society Transactions* 35(6):1414–18.
- Gurevich, Eugenia V. and Vsevolod V. Gurevich. 2006. "Arrestins: Ubiquitous Regulators of Cellular Signaling Pathways." *Genome Biology* 7(9).
- Gurevich, Vsevolod V. and Eugenia V. Gurevich. 2013. "Structural Determinants of Arrestin Functions." Pp. 57–92 in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol. 118. Elsevier Inc.
- Gurevich, Vsevolod V. and Eugenia V. Gurevich. 2020. "Biased GPCR Signaling: Possible Mechanisms and Inherent Limitations." *Pharmacology and Therapeutics* 211:107540.
- Gurevich, Vsevolod V., Susan M. Hanson, Xiufeng. Song, Sergey A. Vishnivetskiy, and Eugenia V. Gurevich. 2011. "Progress in Retinal and Eye Research The Functional Cycle of Visual Arrestins in Photoreceptor Cells." *Progress in Retinal and Eye Research* 30(6):405–30.
- Gurevich, Vsevolod V., Robin Pals-Rylaarsdam, Jeffrey L. Benovic, M. Marlene Hosey, and James J. Onorato. 1997. "Agonist-Receptor-Arrestin, an Alternative Ternary Complex with High Agonist Affinity." *Journal of Biological Chemistry* 272(46):28849–52.
- Gutkind, J. Silvio and Evi Kostenis. 2018. "Arrestins as Rheostats of GPCR Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(10):615–16.
- Haider, Raphael Silvanus, Amod Godbole, and Carsten Hoffmann. 2019. "To Sense or Not to Sense—New Insights from GPCR-Based and Arrestin-Based Biosensors." *Current Opinion in Cell Biology* 57:16–24.
- Hall, Mary P., James Unch, Brock F. Binkowski, Michael P. Valley, Braeden L. Butler, Monika G. Wood, Paul Otto, Kristopher Zimmerman, Gediminas Vidugiris, Thomas MacHleidt, Matthew B. Robers, Hélène A. Benink, Christopher T. Eggers, Michael R. Slater, Poncho L. Meisenheimer, Dieter H. Klaubert, Frank Fan, Lance P. Encell, and Keith V. Wood. 2012. "Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate." *ACS Chemical Biology* 7(11):1848–57.
- Hausdorff, William P., Marc G. Caron, and Robert J. Lefkowitz. 1990. "Turning off the Signal: Desensitization of β -adrenergic Receptor Function." *The FASEB Journal* 4(11):2881–89.
- Hay, Ronald T. 2005. "SUMO: A History of Modification." *Molecular Cell* 18(1):1–12.
- Hayashi, Hiroki, Douglas T. Hess, Rongli Zhang, Keiki Sugi, Huiyun Gao, Bea L. Tan, Dawn E. Bowles, Carmelo A. Milano, Mukesh K. Jain, Walter J. Koch, and Jonathan S. Stamler. 2018. "S-Nitrosylation of β -Arrestins Biases Receptor Signaling and Confers Ligand Independence." *Molecular Cell* 70(3):473–487.e6.
- Heim, Roger, Douglas C. Prasher, and Roger Y. Tsien. 1994. "Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(26):12501–4.

- Hirst, Jennifer and Margaret S. Robinson. 1998. "Clathrin and Adaptors." *Biochimica et Biophysica Acta* 1404(1–2):173–93.
- Honda, Reiko, Hirofumi Tanaka, and Hideyo Yasuda. 1997. "Oncoprotein MDM2 Is a Ubiquitin Ligase E3 for Tumor Suppressor P53." *FEBS Letters* 420(1):25–27.
- Houtsmuller, Adriaan B. 2005. "Fluorescence Recovery after Photobleaching: Application to Nuclear Proteins." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 95:177–99.
- Huang, Weijiao, Matthieu Masurel, Qianhui Qu, John Janetzko, Asuka Inoue, Georgios Skinioitis, and Brian K. Kobilka. 2020. "Structure of the Neurotensin Receptor 1 in Complex with β -Arrestin 1." *Nature* 579(7798):303–8.
- Hunyady, László and Kevin J. Catt. 2006. "Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II." *Molecular Endocrinology* 20(5):953–70.
- Hur, Eun Mi and Kyong Tai Kim. 2002. "G Protein-Coupled Receptor Signalling and Cross-Talk: Achieving Rapidity and Specificity." *Cellular Signalling* 14(5):397–405.
- Hyer, Marc L., Michael A. Milhollen, Jeff Ciavarri, Paul Fleming, Tary Traore, Darshan Sappal, Jessica Huck, Judy Shi, James Gavin, Jim Brownell, Yu Yang, Bradley Stringer, Robert Griffin, Frank Bruzzese, Teresa Soucy, Jennifer Duffy, Claudia Rabino, Jessica Riceberg, Kara Hoar, Anya Lublinsky, Saurabh Menon, Michael Sintchak, Nancy Bump, Sai M. Pulukuri, Steve Langston, Stephen Tirrell, Mike Kuranda, Petter Veiby, John Newcomb, Ping Li, Jing Tao Wu, Josh Powe, Lawrence R. Dick, Paul Greenspan, Katherine Galvin, Mark Manfredi, Chris Claiborne, Benjamin S. Amidon, and Neil F. Bence. 2018. "A Small-Molecule Inhibitor of the Ubiquitin Activating Enzyme for Cancer Treatment." *Nature Medicine* 24(2):186–93.
- Irannejad, Roshanak, Jin C. Tomshine, Jon R. Tomshine, Michael Chevalier, Jacob P. Mahoney, Jan Steyaert, Søren G. F. Rasmussen, Roger K. Sunahara, Hana El-Samad, Bo Huang, and Mark Von Zastrow. 2013. "Conformational Biosensors Reveal GPCR Signalling from Endosomes." *Nature* 495(7442):534–38.
- Jean-Charles, P. Y., J. C. Snyder, and Sudha K. Shenoy. 2016. "Ubiquitination and Deubiquitination of G Protein- Coupled Receptors." Pp. 1–55 in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol. 141.
- Jin, Jianping, Xue Li, Steven P. Gygi, and J. Wade Harper. 2007. "Dual E1 Activation Systems for Ubiquitin Differentially Regulate E2 Enzyme Charging." *Nature* 447(7148):1135–38.
- Just, Sascha, Susann Illing, Michelle Trester-Zedlitz, Elaine K. Lau, Sarah J. Kotowski, Elke Miess, Anika Mann, Christian Doll, Jonathan C. Trinidad, Alma L. Burlingame, Mark Von Zastrow, and Stefan Schulz. 2013. "Differentiation of Opioid Drug Effects by Hierarchical Multi-Site Phosphorylation." *Molecular Pharmacology* 83(3):633–39.

- Kalafatakis, Konstantinos and Konstantinos Triantafyllou. 2011. "Regulatory Peptides Contribution of Neurotensin in the Immune and Neuroendocrine Modulation of Normal and Abnormal Enteric Function." *Regulatory Peptides* 170(1–3):7–17.
- Kao, Shih-Han, Wen-Lung Wang, Chi-Yuan Chen, Yih-Leong Chang, Yi-Ying Wu, Yi-Ting Wang, Shu-Ping Wang, Alexey Nesvizhskii, Yu-Ju Chen, Tse-Ming Hong, and Pan-Chyr Yang. 2015. "Analysis of Protein Stability by the Cycloheximide Chase Assay." *Bio-Protocol* 5(1).
- Kaufmann, Jocelyne E., Alexander Oksche, Claes B. Wollheim, Gabriele Günther, Walter Rosenthal, and Ulrich M. Vischer. 2000. "Vasopressin-Induced von Willebrand Factor Secretion from Endothelial Cells Involves V2 Receptors and CAMP." *Journal of Clinical Investigation* 106(1):107–16.
- Kendall, Ryan T., Erik G. Strungs, Saleh M. Rachidi, Mi Hye Lee, Hesham M. El-Shewy, Deirdre K. Luttrell, Michael G. Janech, and Louis M. Luttrell. 2011. "The β -Arrestin Pathway-Selective Type 1A Angiotensin Receptor (AT 1A) Agonist [Sar1, Ile4, Ile 8]Angiotensin II Regulates a Robust G Protein-Independent Signaling Network." *Journal of Biological Chemistry* 286(22):19880–91.
- Khoury, Etienne, Ljiljana Nikolajev, May Simaan, Yoon Namkung, and Stéphane A. Laporte. 2014. "Differential Regulation of Endosomal GPCR / β -Arrestin Complexes and Trafficking by MAPK." *Journal of Biological Chemistry* 289(34):23302–17.
- Kim, Woong, Eric J. Bennett, Edward L. Huttlin, Ailan Guo, Jing Li, Anthony Possemato, Mathew E. Sowa, Ramin Rad, John Rush, Michael J. Comb, J. Wade Harper, and Steven P. Gygi. 2011. "Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome." *Molecular Cell* 44(2):325–40.
- Kim, Yeong Sang, Samantha G. L. Keyser, and John S. Schneckloth. 2014. "Synthesis of 2',3',4'-Trihydroxyflavone (2-D08), an Inhibitor of Protein Sumoylation." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 24(4):1094–97.
- Kim, You Me, Larry S. Barak, Marc G. Caron, and Jeffrey L. Benovic. 2002. "Regulation of Arrestin-3 Phosphorylation by Casein Kinase II." *Journal of Biological Chemistry* 277(19):16837–46.
- Kobilka, Brian K. 2007. "G Protein Coupled Receptor Structure and Activation." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1768(4):794–807.
- Kommaddi, Reddy Peera and Sudha K. Shenoy. 2013. *Arrestins and Protein Ubiquitination*. Vol. 118. 1st ed. Elsevier Inc.
- Konya, Viktoria, Gunther Marsche, Rufina Schuligoi, and Akos Heinemann. 2013. "E-Type Prostanoid Receptor 4 (EP4) in Disease and Therapy." *Pharmacology and Therapeutics* 138(3):485–502.

- Kovoor, Abraham, Jeremy Colver, Ravil I. Abdryashitov, Charles Chavkin, and Vsevolod V. Gurevich. 1999. "Targeted Construction of Phosphorylation-Independent β -Arrestin Mutants with Constitutive Activity in Cells." *Journal of Biological Chemistry* 274(11):6831–34.
- Kozasa, Tooru, Nicole Hajicek, Christina R. Chow, and Nobuchika Suzuki. 2011. "Signalling Mechanisms of RhoGTPase Regulation by the Heterotrimeric G Proteins G12 and G13." *Journal of Biochemistry* 150(4):357–69.
- Krasel, Cornelius, Moritz Bünemann, Kristina Lorenz, and Martin J. Lohse. 2005. " β -Arrestin Binding To the β 2-Adrenergic Receptor Requires Both Receptor Phosphorylation and Receptor Activation." *Journal of Biological Chemistry* 280(10):9528–35.
- Krasel, Cornelius, Sascha Dammeier, Rainer Winstel, Jörg Brockmann, Harald Mischak, and Martin J. Lohse. 2001. "Phosphorylation of GRK2 by Protein Kinase C Abolishes Its Inhibition by Calmodulin." *Journal of Biological Chemistry* 276(3):1911–15.
- Krupnick, Jason G., Oscar B. Goodman, James H. Keen, and Jeffrey L. Benovic. 1997. "Arrestin/Clathrin Interaction: Localization of the Clathrin Binding Domain of Nonvisual Arrestins to the Carboxy Terminus." *The Journal of Biological Chemistry* 272(23):15011–16.
- Kumari, Punita, Ashish Srivastava, Eshan Ghosh, Ravi Ranjan, Shalini Dogra, Prem N. Yadav, and John York. 2017. "Core Engagement with β -Arrestin Is Dispensable for Agonist-Induced Vasopressin Receptor Endocytosis and ERK Activation." *Molecular Biology of the Cell* 28(8):1003–10.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227:680–85.
- Laporte, Stéphane A., Robert H. Oakley, Jason A. Holt, Larry S. Barak, and Marc G. Caron. 2000. "The Interaction of β -Arrestin with the AP-2 Adaptor Is Required for the Clustering of β 2-Adrenergic Receptor into Clathrin-Coated Pits." *Journal of Biological Chemistry* 275(30):23120–26.
- Large, Valérie, Lena Hellström, Signy Reynisdottir, Fredrik Lönnqvist, Per Eriksson, Lars Lannfelt, and Peter Arner. 1997. "Human Beta-2 Adrenoceptor Gene Polymorphisms Are Highly Frequent in Obesity and Associate with Altered Adipocyte Beta-2 Adrenoceptor Function." *Journal of Clinical Investigation* 100(12):3005–13.
- Latorraca, Naomi R., Matthieu Masureel, Scott A. Hollingsworth, Franziska M. Heydenreich, Carl Mikael Suomivuori, Connor Brinton, Raphael J. L. Townshend, Michel Bouvier, Brian K. Kobilka, and Ron O. Dror. 2020. "How GPCR Phosphorylation Patterns Orchestrate Arrestin-Mediated Signaling." *Cell* 183(7):1813–1825.e18.
- Law, Ping-yee, Yung H. Wong, and Horace H. Loh. 2000. "Molecular Mechanisms and Regulation of Opioid Receptor Signaling." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40:389–430.

- Lee, Mi-Hye, Kathryn M. Appleton, Erik G. Strungs, Joshua Y. Kwon, Thomas A. Morinelli, Yuri K. Peterson, Stephane A. Laporte, and Louis M. Luttrell. 2016. "The Conformational Signature of β -Arrestin2 Predicts Its Trafficking and Signalling Functions." *Nature* 531(7596):665–68.
- Lefkowitz, Robert J. and Erin J. Whalen. 2004. " β -Arrestins : Traffic Cops of Cell Signaling." *Current Opinion in Cell Biology* 16:162–68.
- Leonhardt, Andreas, Alexander Glaser, Markus Wegmann, Dietmar Schranz, Hannsjörg Seyberth, and Rolf Nüsing. 2003. "Expression of Prostanoid Receptors in Human Ductus Arteriosus." *British Journal of Pharmacology* 138(4):655–59.
- Lin, Fang Tsy, Kathleen M. Krueger, Humphrey E. Kendall, Yehia Daaka, Zoey L. Fredericks, Julie A. Pitcher, and Robert J. Lefkowitz. 1997. "Clathrin-Mediated Endocytosis of the β -Adrenergic Receptor Is Regulated by Phosphorylation/Dephosphorylation of β -Arrestin1." *Journal of Biological Chemistry* 272(49):31051–57.
- Lohse, Martin J. 1993. "Molecular Mechanisms of Membrane Receptor Desensitization." *BBA - Molecular Cell Research* 1179(2):171–88.
- Lohse, Martin J., Jeffrey L. Benovic, Juan Codina, Marc G. Caron, and Robert J. Lefkowitz. 1990. " β -Arrestin : A Protein That Regulates β -Adrenergic Receptor Function." *Science* 248(4962):1547–50.
- Lohse, Martin J. and Davide Calebiro. 2013. "Receptor Signals Come in Waves." *Nature* 495:457.
- Lohse, Martin J. and Carsten Hoffmann. 2014. "Arrestin Interactions with G Protein-Coupled Receptors." Pp. 15–56 in *Arrestins - Pharmacology and Therapeutic Potential, Handbook of Experimental Pharmacology* 219.
- Lohse, Martin J., Susanne Nuber, and Carsten Hoffmann. 2012. "Fluorescence/Bioluminescence Resonance Energy Transfer Techniques to Study G-Protein-Coupled Receptor Activation and Signaling." *Pharmacological Reviews* 64(2):299–336.
- Lüscher, Christian and Paul A. Slesinger. 2010. "Emerging Roles for G Protein-Gated Inwardly Rectifying Potassium (GIRK) Channels in Health and Disease." *Nature Reviews Neuroscience* 11(5):301–15.
- Luttrell, Louis M., Francine L. Roudabush, Eric W. Choy, William E. Miller, Michael E. Field, Kristen L. Pierce, and Robert J. Lefkowitz. 2001. "Activation and Targeting of Extracellular Signal-Regulated Kinases by β -Arrestin Scaffolds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(5):2449–54.
- Mafi, Amirhossein, Soo Kyung Kim, and William A. Goddard. 2020. "Mechanism of β -Arrestin Recruitment by the μ -Opioid G Protein-Coupled Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(28):16346–55.

- Mann, Anika, Susann Illing, Elke Miess, and Stefan Schulz. 2015. "Different Mechanisms of Homologous and Heterologous μ -Opioid Receptor Phosphorylation." *British Journal of Pharmacology* 172(2):311–16.
- Marchese, Adriano, Catherine Chen, You-me Kim, and Jeffrey L. Benovic. 2003. "The Ins and Outs of G Protein-Coupled Receptor Trafficking." *Trends in Biochemical Sciences* 28(7):369–76.
- Marchese, Adriano and JoAnn Trejo. 2013. "Ubiquitin-Dependent Regulation of G Protein-Coupled Receptor Trafficking and Signaling." *Cellular Signalling* 25(3):707–13.
- Marinissen, Maria Julia and J. Silvio Gutkind. 2001. "G-Protein-Coupled Receptors and Signaling Networks: Emerging Paradigms." *Trends in Pharmacological Sciences* 22(7):368–76.
- Mayer, Daniel, Fred F. Damberger, Mamidi Samarasimhareddy, Miki Feldmueller, Ziva Vuckovic, Tilman Flock, Brian Bauer, Eshita Mutt, Franziska Zosel, Frédéric H. T. Allain, Jörg Standfuss, Gebhard F. X. Schertler, Xavier Deupi, Martha E. Sommer, Mattan Hurevich, Assaf Friedler, and Dmitry B. Veprintsev. 2019. "Distinct G Protein-Coupled Receptor Phosphorylation Motifs Modulate Arrestin Affinity and Activation and Global Conformation." *Nature Communications* 10(1):1261.
- McClellan, Amie J., Sophie Heiden Laugesen, and Lars Ellgaard. 2019. "Cellular Functions and Molecular Mechanisms of Non-Lysine Ubiquitination." *Open Biology* 9(9).
- McCudden, C. R., M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski, and F. S. Willard. 2005. "G-Protein Signaling: Back to the Future." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(5):551–77.
- McPherson, Jamie, Guadalupe Rivero, Myma Baptist, Javier Llorente, Suleiman Al-Sabah, Cornelius Krasel, William L. Dewey, Chris P. Bailey, Elizabeth M. Rosethorne, Steven J. Charlton, Graeme Henderson, and Eamonn Kelly. 2010. " μ -Opioid Receptors: Correlation of Agonist Efficacy for Signalling with Ability to Activate Internalization." *Molecular Pharmacology* 78(4):756–66.
- Miess, Elke, Arisbel B. Gondin, Arsalan Yousuf, Ralph Steinborn, Nadja Mösslein, Yunshi Yang, Martin Göldner, Julia G. Ruland, Moritz Bünemann, Cornelius Krasel, MacDonald J. Christie, Michelle L. Halls, Stefan Schulz, and Meritxell Canals. 2018. "Multisite Phosphorylation Is Required for Sustained Interaction with GRKs and Arrestins during Rapid μ -Opioid Receptor Desensitization." *Science Signaling* 11(539):eaas9609.
- Milligan, Graeme and Evi Kostenis. 2006. "Heterotrimeric G-Proteins: A Short History." *British Journal of Pharmacology* 147:S46–55.
- Mizuno, Norikazu and Hiroshi Itoh. 2009. "Functions and Regulatory Mechanisms of Gq-Signaling Pathways." *NeuroSignals* 17(1):42–54.
- Molinoff, Perry B. 1984. " α - and β -Adrenergic Receptor Subtypes: Properties, Distribution and Regulation." *Drugs* 28(Suppl 2):1–15.

- Momand, Jamil, Hsiao Huei Wu, and Gargi Dasgupta. 2000. "MDM2 - Master Regulator of the p53 Tumor Suppressor Protein." *Gene* 242:15–29.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263–73.
- Mulrow, Patrick J. 1999. "Angiotensin II and Aldosterone Regulation." *Regulatory Peptides* 80(1–2):27–32.
- Nakamura, Kumiko, Takahiro Shimizu, Toshihiko Yanagita, Takayuki Nemoto, Keisuke Taniuchi, Shogo Shimizu, Fotios Dimitriadis, Toshio Yawata, Youichirou Higashi, Tetsuya Ueba, and Motoaki Saito. 2014. "Angiotensin II Acting on Brain AT 1 Receptors Induces Adrenaline Secretion and Pressor Responses in the Rat." *Scientific Reports* 4:7248.
- Nakayama, Keiichi I. and Keiko Nakayama. 2006. "Ubiquitin Ligases: Cell-Cycle Control and Cancer." *Nature Reviews Cancer* 6(5):369–81.
- Nedvetsky, Pavel I., Grazia Tamma, Sven Beulshausen, and Giovanna Valenti. 2009. "Regulation of Aquaporin-2 Trafficking." Pp. 133–57 in *Handbook of Experimental Pharmacology* 190.
- Neefjes, Jacques J. and Eric A. J. Reits. 2001. "From Fixed to FRAP: Measuring Protein Mobility and Activity in Living Cells." *Nature Cell Biology* 3(6):E145–47.
- Newman, Robert H., Matthew D. Fosbrink, and Jin Zhang. 2011. "Genetically Encodable Fluorescent Biosensors for Tracking Signaling Dynamics in Living Cells." *Chemical Reviews* 111(5):3614–66.
- Nobles, Kelly N., Ziqiang Guan, Kunhong Xiao, Terrence G. Oas, and Robert J. Lefkowitz. 2007. "The Active Conformation of β -Arrestin1: Direct Evidence for the Phosphate Sensor in the N-Domain and Conformational Differences in the Active States of β -Arrestins1 and -2." *Journal of Biological Chemistry* 282(29):21370–81.
- Nobles, Kelly N., Kunhong Xiao, Seungkirl Ahn, Arun K. Shukla, Christopher M. Lam, Sudarshan Rajagopal, Ryan T. Strachan, Teng Yi Huang, Erin A. Bressler, Makoto R. Hara, Sudha K. Shenoy, Steven P. Gygi, and Robert J. Lefkowitz. 2011. "Distinct Phosphorylation Sites on the β 2-Adrenergic Receptor Establish a Barcode That Encodes Differential Functions of β -Arrestin." *Science Signaling* 4(185).
- O'Brien, Charles A., Tomoki Nakashima, and Hiroshi Takayanagi. 2013. "Osteocyte Control of Osteoclastogenesis." *Bone* 54(2):258–63.
- O'Brien, Joseph B., Joshua C. Wilkinson, and David L. Roman. 2019. "Regulator of G-Protein Signaling (RGS) Proteins as Drug Targets: Progress and Future Potentials." *Journal of Biological Chemistry* 294(49):18571–85.
- Oakley, Robert H., Stéphane A. Laporte, Jason A. Holt, Larry S. Barak, and Marc G. Caron. 1999. "Association of β -Arrestin with G Protein-Coupled Receptors during Clathrin-Mediated

- Endocytosis Dictates the Profile of Receptor Resensitization." *Journal of Biological Chemistry* 274(45):32248–57.
- Oakley, Robert H., Stéphane A. Laporte, Jason A. Holt, Marc G. Caron, and Larry S. Barak. 2000. "Differential Affinities of Visual Arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G Protein-Coupled Receptors Delineate Two Major Classes of Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 275(22):17201–10.
- Ostermaier, Martin K., Christian Peterhans, Rolf Jaussi, Xavier Deupi, and Jörg Standfuss. 2014. "Functional Map of Arrestin-1 at Single Amino Acid Resolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(5):1825–30.
- Ozawa, Kentaro, Erin J. Whalen, Christopher D. Nelson, Yuanyu Mu, Douglas T. Hess, Robert J. Lefkowitz, and Jonathan S. Stamler. 2008. "S-Nitrosylation of β -Arrestin Regulates β -Adrenergic Receptor Trafficking." *Molecular Cell* 31(3):395–405.
- Paradis, Pierre, Nassim Dali-Youcef, Francois W. Paradis, Gaétan Thibault, and Mona Nemer. 2000. "Overexpression of Angiotensin II Type I Receptor in Cardiomyocytes Induces Cardiac Hypertrophy and Remodeling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(2):931–36.
- Pelzer, Christiane, Ingrid Kassner, Konstantin Matentzoglou, Rajesh K. Singh, Hans Peter Wollscheid, Martin Scheffner, Gunter Schmidtke, and Marcus Groettrup. 2007. "UBE1L2, a Novel E1 Enzyme Specific for Ubiquitin." *Journal of Biological Chemistry* 282(32):23010–14.
- Perroy, Julie, Stephanie Pontier, Pascale G. Charest, Muriel Aubry, and Michel Bouvier. 2004. "Real-Time Monitoring of Ubiquitination in Living Cells by BRET." *Nature Methods* 1(3):203–8.
- Peters, Reiner, Jutta Peters, Karl Heinz Tews, and Wolfgang Bähr. 1974. "A Microfluorimetric Study of Translational Diffusion in Erythrocyte Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta* 367(3):282–94.
- Picard, Didier, Elena Suslova, and Pierre André Briand. 2006. "2-Color Photobleaching Experiments Reveal Distinct Intracellular Dynamics of Two Components of the Hsp90 Complex." *Experimental Cell Research* 312(19):3949–58.
- Pickart, Cecile M. and Michael J. Eddins. 2004. "Ubiquitin: Structures, Functions, Mechanisms." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1695(1–3):55–72.
- Pickart, Cecile M. and David Fushman. 2004. "Polyubiquitin Chains: Polymeric Protein Signals." *Current Opinion in Chemical Biology* 8(6):610–16.
- Polge, Cécile, Sandrine Uttenweiler-Joseph, Roza Leulmi, Anne Elisabeth Heng, Odile Burlet-Schiltz, Didier Attaix, and Daniel Taillandier. 2013. "Deciphering the Ubiquitin Proteome: Limits and Advantages of High Throughput Global Affinity Purification-Mass Spectrometry Approaches." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45(10):2136–46.

- Potts, J. T., G. W. Tregear, H. T. Keutmann, H. D. Niall, R. Sauer, L. J. Deftos, B. F. Dawson, M. L. Hogan, and G. D. Aurbach. 1971. "Synthesis of a Biologically Active N-Terminal Tetratriacontapeptide of Parathyroid Hormone." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(1):63–67.
- Probst, William C., Lenore A. Snyder, David I. Schuster, Jürgen Brosius, and Stuart C. Sealfon. 1992. "Sequence Alignment of the G-Protein Coupled Receptor Superfamily." *DNA and Cell Biology* 11(1):1–20.
- Pulvermüller, Alexander, Dieter Maretzki, Maria Rudnicka-Nawrot, W. Clay Smith, Krzysztof Palczewski, and Klaus Peter Hofmann. 1997. "Functional Differences in the Interaction of Arrestin and Its Splice Variant, p 44, with Rhodopsin." *Biochemistry* 36(30):9253–60.
- Rajagopal, Sudarshan, Keshava Rajagopal, and Robert J. Lefkowitz. 2010. "Teaching Old Receptors New Tricks: Biasing Seven-Transmembrane Receptors." *Nature Reviews Drug Discovery* 9(5):373–86.
- Raman, Dayanidhi, Shoji Osawa, Vsevolod V. Gurevich, and Ellen R. Weiss. 2003. "The Interaction with the Cytoplasmic Loops of Rhodopsin Plays a Crucial Role in Arrestin Activation and Binding." *Journal of Neurochemistry* 84(5):1040–50.
- Rasmussen, Søren G.F., Hee Jung Choi, Juan Jose Fung, Els Pardon, Paola Casarosa, Pil Seok Chae, Brian T. Devree, Daniel M. Rosenbaum, Foon Sun Thian, Tong Sun Kobilka, Andreas Schnapp, Ingo Konetzki, Roger K. Sunahara, Samuel H. Gellman, Alexander Pautsch, Jan Steyaert, William I. Weis, and Brian K. Kobilka. 2011. "Structure of a Nanobody-Stabilized Active State of the β_2 Adrenoceptor." *Nature* 469(7329):175–81.
- Rasmussen, Søren G. F., Hee Jung Choi, Daniel M. Rosenbaum, Tong Sun Kobilka, Foon Sun Thian, Patricia C. Edwards, Manfred Burghammer, Venkata R. P. Ratnala, Ruslan Sanishvili, Robert F. Fischetti, Gebhard F. X. Schertler, William I. Weis, and Brian K. Kobilka. 2007. "Crystal Structure of the Human β_2 Adrenergic G-Protein-Coupled Receptor." *Nature* 450(7168):383–87.
- Rasmussen, Søren G.F., Brian T. Devree, Yaozhong Zou, Andrew C. Kruse, Ka Young Chung, Tong Sun Kobilka, Foon Sun Thian, Pil Seok Chae, Els Pardon, Diane Calinski, Jesper M. Mathiesen, Syed T. A. Shah, Joseph A. Lyons, Martin Caffrey, Samuel H. Gellman, Jan Steyaert, Georgios Skiniotis, William I. Weis, Roger K. Sunahara, and Brian K. Kobilka. 2011. "Crystal Structure of the β_2 Adrenergic Receptor-Gs Protein Complex." *Nature* 477(7366):549–57.
- Reyes-Turcu, Francisca E., Karen H. Ventii, and Keith D. Wilkinson. 2009. "Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes." *Annual Review of Biochemistry* 78:363–97.
- Rosenbaum, Daniel M., Vadim Cherezov, Michael A. Hanson, Søren G. F. Rasmussen, Sun Thian Foon, Tong Sun Kobilka, Hee Jung Choi, Xiao Jie Yao, William I. Weis, Raymond C. Stevens, and Brian K. Kobilka. 2007. "GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into β_2 -Adrenergic Receptor Function." *Science* 318(5854):1266–73.

- Ryba, David M., Jieli Li, Conrad L. Cowan, Brenda Russell, Beata M. Wolska, and R. John Solaro. 2017. "Long-Term Biased β -Arrestin Signaling Improves Cardiac Structure and Function in Dilated Cardiomyopathy." *Circulation* 135(11):1056–70.
- Santos, Rita, Oleg Ursu, Anna Gaulton, A. Patrícia Bento, Ramesh S. Donadi, Cristian G. Bologa, Anneli Karlsson, Bissan Al-Lazikani, Anne Hersey, Tudor I. Oprea, and John P. Overington. 2016. "A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets." *Nature Reviews Drug Discovery* 16(1):19–34.
- Santulli, Gaetano, Angela Lombardi, Daniela Sorriento, Antonio Anastasio, Carmine Del Giudice, Pietro Formisano, Francesco Béguinot, Bruno Trimarco, Claudia Miele, and Guido Iaccarino. 2012. "Age-Related Impairment in Insulin Release: The Essential Role of β 2-Adrenergic Receptor." *Diabetes* 61(3):692–701.
- Sarraf, Shireen A., Malavika Raman, Virginia Guarani-Pereira, Mathew E. Sowa, Edward L. Huttlin, Steven P. Gygi, and J. Wade Harper. 2013. "Landscape of the PARKIN-Dependent Ubiquitylome in Response to Mitochondrial Depolarization." *Nature* 496(7445):372–76.
- Scheerer, Patrick and Martha E. Sommer. 2017. "Structural Mechanism of Arrestin Activation." *Current Opinion in Structural Biology* 45:160–69.
- Schmid, Cullen L., Nicole M. Kennedy, Nicolette C. Ross, Kimberly M. Lovell, Zhizhou Yue, Jenny Morgenweck, Michael D. Cameron, Thomas D. Bannister, and Laura M. Bohn. 2017. "Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics Article Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics." *Cell* 171(5):1165–1170.e13.
- Shenoy, Sudha K., Larry S. Barak, Kunhong Xiao, Seungkirl Ahn, Magali Berthouze, Arun K. Shukla, Louis M. Luttrell, and Robert J. Lefkowitz. 2007. "Ubiquitination of β -Arrestin Links Seven-Transmembrane Receptor Endocytosis and ERK Activation." *Journal of Biological Chemistry* 282(40):29549–62.
- Shenoy, Sudha K. and Robert J. Lefkowitz. 2003. "Trafficking Patterns of β -Arrestin and G Protein-Coupled Receptors Determined by the Kinetics of β -Arrestin Deubiquitination." *Journal of Biological Chemistry* 278(16):14498–506.
- Shenoy, Sudha K. and Robert J. Lefkowitz. 2005. "Receptor-Specific Ubiquitination of β -Arrestin Directs Assembly and Targeting of Seven-Transmembrane Receptor Signalosomes." *Journal of Biological Chemistry* 280(15):15315–24.
- Shenoy, Sudha K. and Robert J. Lefkowitz. 2011. " β -Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction." *Trends in Pharmacological Sciences* 32(9):521–33.
- Shenoy, Sudha K., Patricia H. McDonald, Trudy A. Kohout, and Robert J. Lefkowitz. 2001. "Regulation of Receptor Fate by Ubiquitination of Activated β 2-Adrenergic Receptor and β -Arrestin." *Science* 294(5545):1307–13.

- Shenoy, Sudha K., Aalok S. Modi, Arun K. Shukla, Kunhong Xiao, Magali Berthouze, Seungkirl Ahn, Keith D. Wilkinson, William E. Miller, and Robert J. Lefkowitz. 2009. "β-Arrestin-Dependent Signaling and Trafficking of 7-Transmembrane Receptors Is Reciprocally Regulated by the Deubiquitinase USP33 and the E3 Ligase Mdm2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(16):6650–55.
- Shenoy, Sudha K., Kunhong Xiao, Vidya Venkataramanan, Peter M. Snyder, Neil J. Freedman, and Allan M. Weissman. 2008. "Nedd4 Mediates Agonist-Dependent Ubiquitination, Lysosomal Targeting, and Degradation of the β2-Adrenergic Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 283(32):22166–76.
- Shimomura, Osamu, Frank H. Johnson, and Yo Saiga. 1962. "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59:223–39.
- Shrestha, Dilip, Attila Jenei, Péter Nagy, György Vereb, and János Szöllősi. 2015. *Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies*. Vol. 16.
- Shukla, Arun K., Aashish Manglik, Andrew C. Kruse, Kunhong Xiao, Rosana I. Reis, Wei Chou Tseng, Dean P. Staus, Daniel Hilger, Serdar Uysal, Li Yin Huang, Marcin Paduch, Prachi Tripathi-Shukla, Akiko Koide, Shohei Koide, William I. Weis, Anthony A. Kossiakoff, Brian K. Kobilka, and Robert J. Lefkowitz. 2013. "Structure of Active β-Arrestin-1 Bound to a G-Protein-Coupled Receptor Phosphopeptide." *Nature* 497(7447):137–41.
- Shukla, Arun K., Gerwin H. Westfield, Kunhong Xiao, Rosana I. Reis, Li Yin Huang, Prachi Tripathi-Shukla, Jiang Qian, Sheng Li, Adi Blanc, Austin N. Oleskie, Anne M. Dosey, min Su, Cui Rong Liang, Ling Ling Gu, Jin Ming Shan, Xin Chen, Rachel Hanna, Minjung Choi, Xiao Jie Yao, Bjoern U. Klink, Alem W. Kahsai, Sachdev S. Sidhu, Shohei Koide, Pawel A. Penczek, Anthony A. Kossiakoff, Virgil L. Woods, Brian K. Kobilka, Georgios Skiniotis, and Robert J. Lefkowitz. 2014. "Visualization of Arrestin Recruitment by a G-Protein-Coupled Receptor." *Nature* 512(7513):218–22.
- Sigismund, Sara and Simona Polo. 2016. "Strategies to Detect Endogenous Ubiquitination of a Target Mammalian Protein." *Methods in Molecular Biology* 1449:143–51.
- Silva, B. C., A. G. Costa, N. E. Cusano, S. Kousteni, and J. P. Bilezikian. 2011. "Catabolic and Anabolic Actions of Parathyroid Hormone on the Skeleton." *Journal of Endocrinological Investigation* 34(10):801–10.
- Simon, Melvin I., Michael P. Strathmann, and Narasimhan Gautam. 1991. "Diversity of G Proteins in Signal Transduction." *Science (New York, N.Y.)* 252(1971):802–8.
- Singh, A. T. K., A. Gilchrist, T. Voyno-Yasenetskaya, J. M. Radeff-Huang, and P. H. Stern. 2005. "Gα12/Gα13 Subunits of Heterotrimeric G Proteins Mediate Parathyroid Hormone Activation of Phospholipase D in UMR-106 Osteoblastic Cells." *Endocrinology* 146(5):2171–75.

- Smirnova, Darya and Natalia Ugarova. 2015. "Bioanalytical Systems Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer Using Firefly Luciferase." *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 18(10):946–51.
- Smith, Jeffrey S. and Sudarshan Rajagopal. 2016. "The β -Arrestins : Multifunctional Regulators of G Protein-Coupled." *Journal of Biological Chemistry* 291(17):8969–77.
- Smith, W. Clay, Ann H. Milam, Donald Dugger, Anatol Arendts, Paul A. Hargravei, and Krzysztof Palczewskis. 1994. "A Splice Variant of Arrestin." *Journal of Biological Chemistry* 269(22):15407–10.
- Song, Loling, E. J. Hennink, I. Ted Young, and Hans J. Tanke. 1995. "Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy." *Biophysical Journal* 68(6):2588–2600.
- Staub, Olivier and Daniela Rotin. 2006. "Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport." *Physiological Reviews* 86(2):669–707.
- Stauch, Benjamin and Vadim Cherezov. 2018. "Serial Femtosecond Crystallography of G Protein-Coupled Receptors." *Annual Review of Biophysics* 47(March):377–97.
- Staus, Dean P., Hongli Hu, Michael J. Robertson, Alissa L. W. Kleinhenz, Laura M. Wingler, William D. Capel, Naomi R. Latorraca, Robert J. Lefkowitz, and Georgios Skiniotis. 2020. "Structure of the M2 Muscarinic Receptor- β -Arrestin Complex in a Lipid Nanodisc." *Nature* 579(7798):297–302.
- Stes, Elisabeth, Mathias Laga, Alan Walton, Noortje Samyn, Evy Timmerman, Ive De Smet, Sofie Goormachtig, and Kris Gevaert. 2014. "A COFRADIC Protocol to Study Protein Ubiquitination." *Journal of Proteome Research* 13(6):3107–13.
- Stevens, Raymond C., Vadim Cherezov, Vsevolod Katritch, Ruben Abagyan, Peter Kuhn, Hugh Rosen, and Kurt Wüthrich. 2013. "The GPCR Network: A Large-Scale Collaboration to Determine Human GPCR Structure and Function." *Nature Reviews Drug Discovery* 12(1):25–34.
- Stewart, Mikaela D., Tobias Ritterhoff, Rachel E. Klevit, and Peter S. Brzovic. 2016. "E2 Enzymes: More than Just Middle Men." *Cell Research* 26(4):423–40.
- Strungs, Erik G. and Louis M. Luttrell. 2014. "Arrestin-Dependent Activation of ERK and Src Family Kinases." Pp. 225–57 in *Arrestins - Pharmacology and Therapeutic Potential, Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 219.
- Stryer, L. 1978. "Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler." *Annual Review of Biochemistry* 47(5):819–46.
- Syme, Colin A., Peter A. Friedman, and Alessandro Bisello. 2005. "Parathyroid Hormone Receptor Trafficking Contributes to the Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases but Is Not Required for Regulation of CAMP Signaling." *Journal of Biological Chemistry* 280(12):11281–88.

- Syrovatkina, Viktoriya, Kamela O. Alegre, Raja Dey, and Xin Yun Huang. 2016. "Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins." *Journal of Molecular Biology* 428(19):3850–68.
- Tang, Zhongshu, Oussama El Far, Heinrich Betz, and Astrid Scheschonka. 2005. "Pias1 Interaction and Sumoylation of Metabotropic Glutamate Receptor 8." *Journal of Biological Chemistry* 280(46):38153–59.
- Tedford, H. William and Gerald W. Zamponi. 2006. "Direct G Protein Modulation of CaV2 Calcium Channels." *Pharmacological Reviews* 58(4):837–62.
- Thompson, Miles D., Maire E. Percy, W. Mc Intyre Burnham, and David E. C. Cole. 2008. "G Protein-Coupled Receptors Disrupted in Human Genetic Disease." *Methods in Molecular Biology* 448:109–37.
- Thomsen, Alex R. B., Bianca Plouffe, Thomas J. Cahill, Arun K. Shukla, Jeffrey T. Tarrasch, Annie M. Dosey, Alem W. Kahsai, Ryan T. Strachan, Biswaranjan Pani, Jacob P. Mahoney, Liyin Huang, Billy Breton, Franziska M. Heydenreich, Roger K. Sunahara, Georgios Skiniotis, Michel Bouvier, and Robert J. Lefkowitz. 2016. "GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling." *Cell* 166(4):907–19.
- Tohgo, Akira, Eric W. Choy, Diane Gesty-Palmer, Kristen L. Pierce, Stephane Laporte, Robert H. Oakley, Marc G. Caron, Robert J. Lefkowitz, and Louis M. Luttrell. 2003. "The Stability of the G Protein-Coupled Receptor- β -Arrestin Interaction Determines the Mechanism and Functional Consequence of ERK Activation." *Journal of Biological Chemistry* 278(8):6258–67.
- Tóth, András D., Susanne Prokop, Pál Gyombolai, Péter Várnai, András Balla, Vsevolod V. Gurevich, X. László Hunyady, and X. Gábor Turu. 2018. "Heterologous Phosphorylation-Induced Formation of a Stability Lock Permits Regulation of Inactive Receptors by β -Arrestins." *Journal of Biological Chemistry* 293(3):876–92.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9):4350–54.
- Truong, Kevin and Mitsuhiro Ikura. 2001. "The Use of FRET Imaging Microscopy to Detect Protein-Protein Interactions and Protein Conformational Changes in Vivo." *Current Opinion in Structural Biology* 11(5):573–78.
- Tulipano, Giovanni, Ralf Stumm, Manuela Pfeiffer, Volker Ho, and Stefan Schulz. 2004. "Differential β -Arrestin Trafficking and Endosomal Sorting of Somatostatin Receptor Subtypes." *Journal of Biological Chemistry* 279(20):21374–82.
- Turu, Gábor, András Balla, and László Hunyady. 2019. "The Role of β -Arrestin Proteins in Organization of Signaling and Regulation of the AT1 Angiotensin Receptor." *Frontiers in Endocrinology* 10:519.

- Tyler-McMahon, Beth M., Mona Boules, and Elliott Richelson. 2000. "Neurotensin: Peptide for the next Millennium." *Regulatory Peptides* 93(1–3):125–36.
- Udeshi, Namrata D., Tanya Svinkina, Philipp Mertins, Eric Kuhn, D. R. Mani, Jana W. Qiao, and Steven A. Carr. 2013. "Refined Preparation and Use of Anti-Diglycine Remnant (k-ε-GG) Antibody Enables Routine Quantification of 10,000s of Ubiquitination Sites in Single Proteomics Experiments." *Molecular and Cellular Proteomics* 12(3):825–31.
- Van Wijk, Sjoerd J. L., Sjoerd J. De Vries, Patrick Kemmeren, Anding Huang, Rolf Boelens, Alexandre M. J. J. Bonvin, and H. Th Marc Timmers. 2009. "A Comprehensive Framework of E2-RING E3 Interactions of the Human Ubiquitin-Proteasome System." *Molecular Systems Biology* 5(295).
- Vilardaga, Jean Pierre, Moritz Bünemann, Timothy N. Feinstein, Nevin Lambert, Viacheslav O. Nikolaev, Stefan Engelhardt, Martin J. Lohse, and Carsten Hoffmann. 2009. "Minireview: GPCR and G Proteins: Drug Efficacy and Activation in Live Cells." *Molecular Endocrinology* 23(5):590–99.
- Vilardaga, Jean Pierre, Moritz Bünemann, Cornelius Krasel, Marián Castro, and Martin J. Lohse. 2003. "Measurement of the Millisecond Activation Switch of G Protein-Coupled Receptors in Living Cells." *Nature Biotechnology* 21(7):807–12.
- Violin, Jonathan D., Scott M. DeWire, Dennis Yamashita, David H. Rominger, Lisa Nguyen, Kevin Schiller, Erin J. Whalen, Maxine Gowen, and Michael W. Lark. 2010. "Selectively Engaging β-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 335(3):572–79.
- Vishnivetskiy, Sergey A., Carsten Schubert, Gregory C. Climaco, Yulia V. Gurevich, Maria Gabriela Velez, and Vsevolod V. Gurevich. 2000. "An Additional Phosphate-Binding Element in Arrestin Molecule: Implications for the Mechanism of Arrestin Activation." *Journal of Biological Chemistry* 275(52):41049–57.
- Wang, Ping, Hua Gao, Yanxiang Ni, Beibei Wang, Yalan Wu, Lili Ji, Linhua Qin, Lan Ma, and Gang Pei. 2003. "β-Arrestin 2 Functions as a G-Protein-Coupled Receptor-Activated Regulator of Oncoprotein Mdm2." *Journal of Biological Chemistry* 278(8):6363–70.
- Warne, Tony, Patricia C. Edwards, Andrew S. Doré, Andrew G. W. Leslie, and Christopher G. Tate. 2019. "Molecular Basis for High-Affinity Agonist Binding in GPCRs." *Science* 364(6442):775–78.
- Whalen, Erin J., Sudarshan Rajagopal, and Robert J. Lefkowitz. 2011. "Therapeutic Potential of β-Arrestin- and G Protein-Biased Agonists." *Trends in Molecular Medicine* 17(3):126–39.
- Wilden, U., S. W. Hall, and H. Kohn. 1986. "Phosphodiesterase Activation by Photoexcited Rhodopsin Is Quenched When Rhodopsin Is Phosphorylated and Binds the Intrinsic 48-kDa Protein of Rod Outer Segment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(5):1174–78.

- Wisler, James W., Kunhong Xiao, Alex R. B. Thomsen, and Robert J. Lefkowitz. 2014. "Recent Developments in Biased Agonism." *Current Opinion in Cell Biology* 27:18–24.
- Wootten, Denise, Arthur Christopoulos, Maria Marti-Solano, M. Madan Babu, and Patrick M. Sexton. 2018. "Mechanisms of Signalling and Biased Agonism in G Protein-Coupled Receptors." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(10):638–53.
- Wyatt, Debra, Rohit Malik, Alissa C. Vesecky, and Adriano Marchese. 2011. "Small Ubiquitin-like Modifier Modification of Arrestin-3 Regulates Receptor Trafficking." *Journal of Biological Chemistry* 286(5):3884–93.
- Xiao, Kunhong, Daniel B. McClatchy, Arun K. Shukla, Yang Zhao, Minyong Chen, Sudha K. Shenoy, John R. Yates, and Robert J. Lefkowitz. 2007. "Functional Specialization of β -Arrestin Interactions Revealed by Proteomic Analysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(29):12011–16.
- Xiao, Ning, Hui Li, Wenhan Mei, and Jinke Cheng. 2015. "SUMOylation Attenuates Human β -Arrestin 2 Inhibition of IL-1R/TRAFF6 Signaling." *Journal of Biological Chemistry* 290(4):1927–35.
- Xu, Jianrong, Panpan Tan, Hui Li, Yongyao Cui, Yu Qiu, Hao Wang, Xuan Zhang, Juan Li, Liang Zhu, Wei Zhou, and Hongzhuan Chen. 2019. "Direct SUMOylation of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Increases Its Ligand-Binding Affinity and Signal Transduction." *FASEB Journal* 33(3):3237–51.
- Xu, Yao, David W. Piston, and Carl Hirschie Johnson. 1999. "A Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) System: Application to Interacting Circadian Clock Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(1):151–56.
- Yang, Zhao, Fan Yang, Daolai Zhang, Zhixin Liu, Amy Lin, Chuan Liu, Peng Xiao, Xiao Yu, and Jin Peng Sun. 2017. "Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors: From the Barcode Hypothesis to the Flute Model." *Molecular Pharmacology* 92(3):201–10.
- Yin, Wanchao, Zhihai Li, Mingliang Jin, Yu Ling Yin, Parker W. de Waal, Kuntal Pal, Yanting Yin, Xiang Gao, Yuanzheng He, Jing Gao, Xiaoxi Wang, Yan Zhang, Hu Zhou, Karsten Melcher, Yi Jiang, Yao Cong, X. Edward Zhou, Xuekui Yu, and H. Eric Xu. 2019. "A Complex Structure of Arrestin-2 Bound to a G Protein-Coupled Receptor." *Cell Research* 29(12):971–83.
- Zhang, Jie, Larry S. Barak, Pieter H. Anborgh, Stephane A. Laporte, Marc G. Caron, and Stephen S. G. Ferguson. 1999. "Cellular Trafficking of G Protein-Coupled Receptor/ β -Arrestin Endocytic Complexes." *Journal of Biological Chemistry* 274(16):10999–6.
- Zhang, Jie, Stephen S. G. Ferguson, Larry S. Barak, Sobha R. Bodduluri, Stephane A. Laporte, Ping-yee Law, and Marc G. Caron. 1998. "Role for G Protein-Coupled Receptor Kinase in Agonist-Specific Regulation of μ -Opioid Receptor Responsiveness." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(12):7157–62.

- Zhou, Qingtong, Dehua Yang, Meng Wu, Yu Guo, Wanjing Guo, Li Zhong, Xiaoqing Cai, Antao Dai, Wonjo Jang, Eugene Shakhnovich, Zhi Jie Liu, Raymond C. Stevens, Nevin A. Lambert, M. Madan Babu, Ming Wei Wang, and Suwen Zhao. 2019. "Common Activation Mechanism of Class a GPCRs." *ELife* 8:e50279.
- Zhou, X. Edward, Yuanzheng He, Parker W. de Waal, Xiang Gao, Yanyong Kang, Ned Van Eps, Yan-ting Yin, Kuntal Pal, Devrishi Goswami, Thomas A. White, Anton Barty, Naomi R. Latorraca, Henry N. Chapman, Wayne L. Hubbell, Ron O. Dror, Raymond C. Stevens, Vadim Cherezov, Vsevolod V. Gurevich, Patrick R. Griffin, Oliver P. Ernst, Karsten Melcher, and H. Eric Xu. 2017. "Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors." *Cell* 170(3):457-469.e13.
- Zindel, Diana. 2015. "Die zeitliche Stabilität und zelluläre Lokalisation von Arrestin-Rezeptorkomplexen wird durch die Rezeptorphosphorylierung determiniert."
- Zindel, Diana, Adrian J. Butcher, Suleiman Al-Sabah, Peter Lanzerstorfer, Julian Weghuber, Andrew B. Tobin, Moritz Bünemann, and Cornelius Krasel. 2015. "Engineered Hyperphosphorylation of the β 2-Adrenoceptor Prolongs Arrestin-3 Binding and Induces Arrestin Internalization." *Molecular Pharmacology* 87(2):349–62.
- Zindel, Diana, Sandra Engel, Andrew R. Bottrill, Jean Philippe Pin, Laurent Prézeau, Andrew B. Tobin, Moritz Bünemann, Cornelius Krasel, and Adrian J. Butcher. 2016. "Identification of Key Phosphorylation Sites in PTH1R That Determine Arrestin3 Binding and Fine-Tune Receptor Signaling." *Biochemical Journal* 473(22):4173–92.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Typischer Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors	3
Abbildung 1.2 Vergleich der aktiven und inaktiven Konformation des β_2 AR	4
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des G-Protein-Zyklus	5
Abbildung 1.4 Die vier G-Protein-Familien und ihre wichtigsten Effektoren	6
Abbildung 1.5 Zweistufige Abschaltung des G-Protein-Signals durch GRK und Arrestin	7
Abbildung 1.6 Inaktive Struktur von Arrestin-1	13
Abbildung 1.7 Vergleich der Kristallstrukturen von Arrestin-2 in basaler und aktiver Konformation .	14
Abbildung 1.8 Cryo-EM-Struktur von Arrestin-2 im Komplex mit dem M_2 R	15
Abbildung 1.9 Hängende und feste Konformation des Arrestin-Rezeptor-Komplexes	15
Abbildung 1.10 Recycling oder Abbau internalisierter GPCRs	17
Abbildung 1.11 Einteilung von GPCRs anhand ihres Internalisierungsverhaltens	18
Abbildung 1.12 Die "Barcode"-Hypothese zur Phosphorylierung von GPCRs	21
Abbildung 1.13 Verschiedene Arten der Ubiquitinierung	22
Abbildung 1.14 Mechanismus der Ubiquitinierung von Substratproteinen	23
Abbildung 1.15 Differentielle Ubiquitinierung von β -Arrestin-2 nach der Stimulation von Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren	25
Abbildung 3.1 Temperaturprofil einer PCR	52
Abbildung 3.2 Subklonierung mit kompatiblen Schnittstellen für Restriktionsenzyme	53
Abbildung 3.3 Subklonierung mit PCR zum Einfügen von Schnittstellen für Restriktionsenzyme	54
Abbildung 3.4 Schematischer Ablauf eines Gibson-Assemblys	59
Abbildung 3.5 Allgemeiner schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops	65
Abbildung 3.6 FRET-Effizienz	67
Abbildung 3.7 Spektrale Überlappung	67
Abbildung 3.8 Schematischer Aufbau des FRET-Mikroskops	68
Abbildung 3.9 Fluorophor-Spektren	69
Abbildung 3.10 Repräsentative FRET-Messung	71
Abbildung 3.11 Durchführung der Bleichkorrektur	72
Abbildung 3.12 Bestimmung der Auswaschkinetik	72
Abbildung 3.13 Repräsentative FRET-Messung mit dem Tecan Spark	74
Abbildung 3.15 Schematischer Aufbau eines Konfokalmikroskops	77
Abbildung 3.16 Vergleich von Weitfeldfluoreszenz- und Konfokalmikroskopie	78
Abbildung 3.19 Schematische Darstellung der Detektoreinheit	80
Abbildung 3.17 Fluorophor-Spektren CFP & YFP	80
Abbildung 3.18 Fluorophor-Spektren GFP & mCherry	80
Abbildung 3.20 Repräsentative konfokale Aufnahme mit ROI zur Auswertung der Colokalisation	81
Abbildung 3.21 Schematische Illustration des FRAP-Prinzips	82

Abbildung 3.22 Schematische Illustration der Messung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Zweifarben-FRAP	83
Abbildung 3.23 Auswertung einer FRAP-Messung	86
Abbildung 3.24 Schematische Darstellung der Durchführung einer Immunopräzipitation	90
Abbildung 3.25 Schematische Darstellung einer SDS-Polyacryl-amid-Gelelektrophorese	91
Abbildung 3.26 Schematischer Aufbau eines Western Blots	92
Abbildung 3.27 Schematische Darstellung der Immunodektektion membrangebundener Proteine ...	93
Abbildung 4.1 Bestimmung der Affinität verschiedener Arr3-Mutanten zum β_2V_2R mittels FRAP	97
Abbildung 4.2 Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation verschiedener Rezeptoren	99
Abbildung 4.2 Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation verschiedener Rezeptoren	100
Abbildung 4.2 Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation verschiedener Rezeptoren	101
Abbildung 4.3 Quantifizierung der Colokalisation zwischen Rezeptoren und Arrestin-3	102
Abbildung 4.4 Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation des AT_1R	103
Abbildung 4.5 Zelluläre Lokalisation von Arr3-Varianten nach Stimulation des V_2R	104
Abbildung 4.6 Zelluläre Lokalisation von Arr3 KK11RR nach Stimulation des V_2R mit serumfreiem Medium und/oder ohne GRK2	105
Abbildung 4.7 Untersuchung des Ubiquitinierungslevels der Arr3-Varianten mittels Immunopräzipitation	106
Abbildung 4.8 Interaktion von Arr3 noK mit verschiedenen Rezeptoren in FRET-Messungen	107
Abbildung 4.9 Zelluläre Lokalisation von Arr3 noK nach Stimulation des PTHR	108
Abbildung 4.10 Interaktion von Arr3 und Ubiquitin in FRET-Messungen	109
Abbildung 4.11 Interaktion von Arr3 und Ubiquitin in BRET-Messungen	110
Abbildung 4.12 Untersuchung der Ubiquitinierungslevel von Arr3 mittels Immunopräzipitation	111
Abbildung 4.13 In den MS-Ergebnissen identifizierte Peptidfragmente von Arrestin-3	112
Abbildung 4.14 Von den MS-Ergebnissen abgedeckte Bereiche in der Oberflächendarstellung von Arrestin-3 (PDB: 5TV1)	113
Abbildung 4.15 Lokalisation von K178 in der Oberflächendarstellung von Arrestin-3 (PDB: 5TV1)	113
Abbildung 4.16 Interaktion von Arr3 K178R mit dem PTHR in FRET-Messungen	114
Abbildung 4.17 Zelluläre Lokalisation von Arr3 K178R nach Stimulation des PTHR	115
Abbildung 4.18 Untersuchung des Ubiquitinierungslevels von Arr3 K178R mittels Immunopräzipitation	115
Abbildung 4.19 Untersuchung der Expression von Arr3 K178R mittels Western Blot	116
Abbildung 4.20 Untersuchung der Proteinstabilität von Arr3 K178R mittels Cycloheximid	117

Abbildung 4.21	Lokalisation der ausgewählten Ubiquitinierungsstellen in der Oberflächen-	
	darstellung von Arrestin-3 (PDB: 5TV1)	118
Abbildung 4.22	Interaktion der Arr3-Einzelmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen	119
Abbildung 4.23	Zelluläre Lokalisation der Arr3-Einzelmutanten nach Stimulation des PTHR	120
Abbildung 4.23	Zelluläre Lokalisation der Arr3-Einzelmutanten nach Stimulation des PTHR	121
Abbildung 4.24	Quantifizierung der Colokalisation zwischen PTHR und den Arrestin-3-	
	Einzelmutanten	121
Abbildung 4.25	Untersuchung des Ubiquitinierungslevels der Arr3-Einzelmutanten mittels	
	Immunopräzipitation	122
Abbildung 4.26	Interaktion der Arr3-Mehrfachmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen	123
Abbildung 4.27	Zelluläre Lokalisation von Arr3-Mehrfachmutanten nach Stimulation des PTHR ...	125
Abbildung 4.28	Zelluläre Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation verschiedener	
	Rezeptoren	126
Abbildung 4.29	Zelluläre Lokalisation von Arr3 6K→R nach Stimulation verschiedener	
	Rezeptoren	127
Abbildung 4.30	Interaktion weiterer Arr3-Mehrfachmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-	
	Messungen	128
Abbildung 4.31	Zelluläre Lokalisation weiterer Arr3-Mehrfachmutanten nach Stimulation des	
	PTHR	129
Abbildung 4.32	Zelluläre Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation verschiedener	
	Rezeptoren	130
Abbildung 4.33	Zelluläre Lokalisation von Arr3 4K→R nach Stimulation verschiedener	
	Rezeptoren	131
Abbildung 4.34	Bestimmung der Affinität der Arr3-Mehrfachmutanten zum β_2AR -SSS mittels	
	FRAP	132
Abbildung 4.35	Interaktion der Arr3-Dreifachmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen	133
Abbildung 4.36	Zelluläre Lokalisation der Arr3-Dreifachmutanten nach Stimulation des PTHR	134
Abbildung 4.37	Interaktion der Arr3-Doppelmutanten mit dem β_2V_2R in FRET-Messungen	135
Abbildung 4.38	Zelluläre Lokalisation der Arr3-Doppelmutanten nach Stimulation des PTHR	136
Abbildung 4.39	Zelluläre Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation verschiedener	
	Rezeptoren	137
Abbildung 4.39	Zelluläre Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation verschiedener	
	Rezeptoren	138
Abbildung 4.40	Zelluläre Lokalisation von Arr3 K108R K178R nach Stimulation verschiedener	
	Rezeptoren	139
Abbildung 4.41	Bestimmung der Affinität der Arr3-Doppelmutanten zum β_2AR -SSS mittels FRAP	140
Abbildung 4.42	Untersuchung des Ubiquitinierungslevels der Arr3-Doppelmutanten mittels	
	Immunopräzipitation	141

Abbildung 4.43 Untersuchung der zellulären Ubiquitinierung nach Applikation verschiedener Konzentrationen TAK-243	142
Abbildung 4.44 Untersuchung der zellulären Ubiquitinierung sowie der Ubiquitinierung von Arrestin-3 nach unterschiedlich langer Applikation von 1 μ M TAK-243	143
Abbildung 4.45 Vergleich von immunopräzipitiertem und rekombinantem Arr3-FLAG	144
Abbildung 4.46 Lokalisation von p53 und Mdm2 in HEK293T-Zellen	145
Abbildung 4.47 Lokalisation von p53 und Mdm2 in NIH/3T3-Zellen	146
Abbildung 4.48 Zelluläre Lokalisation von Arr3 nach Applikation von TAK-243 und Aktivierung des PTHR	147
Abbildung 4.49 Zelluläre Lokalisation von Arr3 nach Applikation von 2-D08 und Aktivierung des PTHR	149
Abbildung 4.50 Interaktion von Arrestin-3 mit dem μ OR in FRET-Messungen	150
Abbildung 4.51 Interaktion von Arrestin-3 mit dem μ OR in FRAP-Messungen	151
Abbildung 4.52 Lokalisation von Arr3 nach Aktivierung des μ OR mit verschiedenen Agonisten	152
Abbildung 4.53 Lokalisation von Arr3 nach Aktivierung des β_2 AR mit verschiedenen Agonisten	153
Abbildung 5.1 Vergleich von FRET und FRAP	155
Abbildung 5.2 Ausschnitt der Kristallstruktur von Arrestin-2 im Komplex mit V ₂ Rpp	159

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 2.2 Verwendete Chemikalien	31
Tabelle 2.3 Verwendete Reagenzien und Kits für die Zellkultur	31
Tabelle 2.4 Verwendete Reagenzien und Kits für proteinbiochemische Methoden	32
Tabelle 2.5 Verwendete Reagenzien und Kits für Klonierungen	32
Tabelle 2.6 Verwendete Agonisten	33
Tabelle 2.7 Verwendete Primär-Antikörper	33
Tabelle 2.8 Verwendete Sekundärantikörper	33
Tabelle 2.9 Verwendete Laborgeräte	34
Tabelle 2.10 Mikroskop	35
Tabelle 2.11 Verwendete Programme und Datenbanken	35
Tabelle 2.12 Verwendete Plasmide	38
Tabelle 2.13 Verwendete PCR-Primer	39
Tabelle 2.14 DMEM-Supplementation	40
Tabelle 2.15 Rezeptur für LB-Medium	40
Tabelle 2.16 Rezeptur für LB-Agar	40
Tabelle 2.17 Rezeptur für TSB-Puffer	41
Tabelle 2.18 Rezeptur für KCM-Puffer	41
Tabelle 2.19 Rezeptur für Ampicillin-Stammlösung	41
Tabelle 2.20 Rezeptur für Kanamycin-Stammlösung	41
Tabelle 2.21 Rezeptur für TAE-Puffer 50x	42
Tabelle 2.22 Rezeptur für Lösung 1	42
Tabelle 2.23 Rezeptur für Lösung 2	42
Tabelle 2.24 Rezeptur für Lösung 3	42
Tabelle 2.25 Rezeptur für FRET-Puffer	43
Tabelle 2.26 Rezeptur für 1,5 M Tris-Lösung	43
Tabelle 2.27 Rezeptur für 0,5 M Tris-Lösung	43
Tabelle 2.28 Rezeptur für 12%-iges Trenngel	44
Tabelle 2.29 Rezeptur für Sammelgel	44
Tabelle 2.30 Rezeptur für Lysepuffer	45
Tabelle 2.31 Rezeptur für SDS-Probenpuffer	45
Tabelle 2.32 Rezeptur für Laufpuffer 10x	45
Tabelle 2.33 Rezeptur für Transferpuffer 10x	46
Tabelle 2.34 Rezeptur für TBS 10x	46
Tabelle 2.35 Rezeptur für TBS-T	46
Tabelle 2.36 Rezeptur für Stripping-Puffer	46

Tabelle 2.37 Rezeptur für Puffer für Trypsin-Verdau	47
Tabelle 2.38 Rezeptur für Rosetta-Lysepuffer	47
Tabelle 3.1 Reaktionsansätze für PCR	51
Tabelle 3.2 Standardprotokolle für PCR	51
Tabelle 3.3 Reaktionsansatz für Restriktionsverdau	55
Tabelle 3.4 Reaktionsansatz für Ligation	57

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

"Untersuchungen zu Mechanismen der Co-Internalisierung von Arrestin-3 mit GPCRs"

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 01.06.2021

.....
(Nadja Mößlein)

Lebenslauf

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all jenen zu bedanken, die mich durch meine Promotionszeit begleitet und geleitet haben.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Bünemann für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe an diesem interessanten Thema forschen zu können. Für die Unterstützung meiner Arbeit und die konstruktiven und motivierenden Ratschläge bin ich sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Cornelius für die intensive Betreuung, die Ideen, die das Projekt vorangebracht haben sowie die vielen Tipps und Tricks im Labor. Besonders freut es mich nach wie vor, dass ich so viele verschiedene Methoden erlernen und anwenden durfte, die nicht zum Standardrepertoire der Arbeitsgruppe gehören. Vielen Dank dafür, dass Deine Tür jederzeit für unzählige Fragen offen stand und Du fast jede davon beantworten konntest.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an die aktuellen und ehemaligen Kollegen der AG Bünemann für die großartige Atmosphäre und die so selbstverständliche gegenseitige Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Danke für die schöne Zeit im Labor und die unvergesslichen Ausflüge, Konferenzen und sonstigen Aktivitäten, z.B. mit Riesenschlauchbooten, Alpakas oder Long Horn Gin.

Vielen Dank auch an Emma, Sandra und Susen, die uns Doktoranden im Labor immer den Rücken freihalten und für eine reibungslose Organisation des Laboralltags sorgen.

Meinen Wahlpflicht- und Neuromasterpraktikanten danke ich für die interessierte und tatkräftige Mitarbeit an meinen Projekten und wünsche ihnen viel Erfolg für die Zukunft.

Ich danke Prof. Gerhard Schratt und Prof. Marco Rust für die Möglichkeit, das Konfokalmikroskop in ihrem Labor nutzen zu dürfen und den Mitgliedern der Arbeitsgruppen für die schnelle und freundliche Hilfe bei allen auftretenden Problemen und die generelle Organisation rund um das Mikroskop.

Danke an die Mitglieder der AG Culmsee für die gegenseitige Unterstützung in allen Western-Blot-Fragen und das Teilen von Erfolgserlebnissen (selten) und Leidensgeschichten (häufig).

Ich danke den vielen lieben Menschen, die ich in Marburg sonst noch kennen und schätzen gelernt habe, für die schöne Zeit außerhalb des Labors.

Meiner Familie danke ich für die bedingungslose Unterstützung und den Rückhalt, die es mir ermöglicht haben, meinen eigenen Weg zu gehen, auch wenn dieser so ganz anders war. Ohne euch hätte ich es gar nicht erst so weit geschafft.